ISSN 0181-1584

CRYPTOGAMIE

MYCOLOGIE

TOME 11 Fascicule 1 1990

LABORATOIRE DE CRYPTOGAMIE
MUSÉUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE
12, RUE BUFFON, 75005 PARIS



PUBLICATION TRIMESTRIELLE

Mars 1990

SOMMAIRE

CONTENTS

CRYPTOGAMIE

MYCOLOGIE

TOME 11 Fascicule 1 1990

Ancienne Revue de Mycologie. Dirigée par Roger HEIM

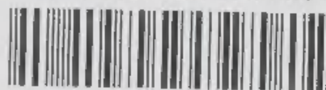


DIRECTEUR SCIENTIFIQUE : Madame J. NICOT
SECRÉTAIRE DE RÉDACTION : Mme M.-C. BOISSELIER. ÉDITEUR : A.D.A.C.

Publié avec le concours du Muséum National d'Histoire Naturelle

CRYPTOGAMIE, MYCOLOGIE est indexé par : *Biological Abstracts, Current Contents,*

Publications bibliographiques du CDST (Pascal).



MICROFLORE FONGIQUE DE LA CARPOSPHÈRE DE POMMES À CIDRE

par Claude BIZEAU, Claude MOREAU,
Philippe MICHEL et Dominique PONCHANT

Laboratoire de Microbiologie Appliquée,
Faculté des Sciences et Techniques,
29287 Brest Cedex, France

RÉSUMÉ - L'inventaire des champignons filamenteux et des levures présents à la surface de pommes à cidre des variétés "Douce Coetligne" et "Loccart vert" a été dressé à partir de 3 vergers de Bretagne régulièrement suivis 2 années consécutives. L'analyse mycologique réalisée sur 8 sites par fruit permet d'établir l'abondance relative des diverses espèces. 47 champignons filamenteux et 36 levures furent isolés. Trois espèces apparaissent dominantes: *Aureobasidium pullulans*, *Epicoccum purpurascens* et *Cryptococcus laurentii*; les autres se regroupent en endémiques (*Alternaria, Cladosporium*), erratiques (*Mucor, Penicillium*) ou rares. Les variations liées aux cultivars de pommes ou aux conditions externes sont de faible importance. La flore levurienne de la carposphère susceptible d'intervenir dans la préparation du cidre, parce qu'insuffisamment représentée, ne semble pas permettre une maîtrise naturelle de la fermentation.

ABSTRACT - The list of filamentous fungi and yeasts found at the surface of cider apples var. "Douce Coetligne" and "Loccart vert" has been drawn up to 3 orchards from Brittany for two consecutive years. The mycological analyse made on 8 points per fruit has allowed to define the relative abundance of each species. 47 filamentous fungi and 36 yeasts has been isolated. Three species are dominant: *Aureobasidium pullulans*, *Epicoccum purpurascens* and *Cryptococcus laurentii*; the others may be labelled as endemic (*Alternaria, Cladosporium*), erratic (*Mucor, Penicillium*) or uncommon. The variations due to cultivars of apples or to external conditions are of minor importance. The yeast flora of the carposphere able to act in the cider making is not sufficiently present to allow a natural control of the fermentive process.

MOTS CLÉS : carposphère, champignons filamenteux, levures, pommes à cidre.

INTRODUCTION

La mycoflore des pommes à couteau a déjà été inventoriée, qu'il s'agisse soit d'un développement superficiel de champignons filamenteux (Moreau

C. & Moreau M., 1960), soit d'accidents de conservation survenus malgré les soins apportés tant au verger qu'à la cueillette, pendant le conditionnement ou l'entreposage (Moreau & al., 1965, 1966).

Peu de travaux, par contre, concernent les pommes destinées aux industries de transformation, à l'exception de ceux orientés vers la recherche de levures utiles à la fabrication du cidre (Beech & Davenport, 1970) ou, plus récemment, consacrés aux champignons filamenteux susceptibles d'élaborer des mycotoxines dangereuses dans l'alimentation (Moreau & al., 1981).

La présente étude vise essentiellement à répertorier l'ensemble de la microflore fongique de la carposphère et envisager son rôle dans la préparation et la qualité du cidre; elle a porté à la fois sur les champignons filamenteux et sur les levures des pommes de trois vergers de Bretagne.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Échantillonnage au verger

Les pommes étudiées proviennent de deux vergers du val de Rance (l'un conduit en basse tige, l'autre en haute tige) et d'un verger du bassin de Rennes (conduit en basse tige). Il s'agit de plantations en mélange de deux variétés bretonnes traditionnelles:

- *Douce Coetligne*, pomme dite "à cidre", pauvre en acidité, riche en tannins,

- *Loccart vert*, dite "à jus", riche en acidité, pauvre en tannins.

Dans tous les cas, le sol est couvert de gazon.

Des lots de fruits sont cueillis[1] tous les 10 jours du 15 septembre au 15 novembre deux années consécutives (1987-1988).

Échantillonnage au laboratoire

Dès leur arrivée au laboratoire, les fruits sont stockés à 4°C dans leur emballage d'origine.

Trois pommes de chaque échantillon sont retenues 15 jours après la date de cueillette indiquée.

L'isolement des champignons filamenteux et des levures est réalisé à partir des zones épidermiques selon le protocole suivant: huit sites de prélèvements de fragments (d'environ 0,06cm^2 chacun) sont définis sur une

---

(1) Les échantillons de pommes ont été aimablement fournis par M. J.F. Drilleau, Directeur de la Station de Recherches cidricoles, INRA, Le Rheu. Qu'il reçoive ici nos remerciements.

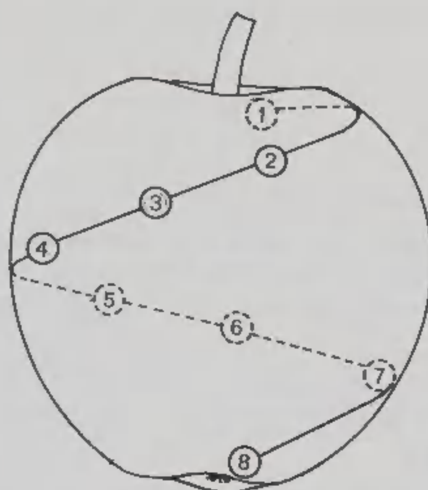


Figure 1 - Emplacement des prélèvements de fragments d'épiderme sur chaque pomme en vue de l'isolement des champignons.

Figure 1 - Localization of takings of epidermal samples on each apple for the isolation of fungi.

pomme selon une spirale partant de la cuvette pédonculaire et aboutissant à l'oeil (Fig. 1).

Pour rechercher les champignons filamenteux, chaque fragment est déposé en boîte de Pétri sur un milieu gélosé de malt 2% complémenté en extrait de levures. Après l'incubation à 25°C, l'examen des boîtes est réalisé à plusieurs reprises tant pour purifier que pour identifier les espèces.

Pour l'isolement des levures, chaque fragment (prélevé tout à côté du fragment utilisé pour les champignons filamenteux) est lavé à cinq reprises avec de l'eau physiologique stérile (2ml) en agitant à l'appareil Vortex. La suspension obtenue est étalée sur le milieu d'isolement (extrait de levures 0,5%, glucose 1%, gélose 1,5%, pénicilline 100 U/ml, streptomycine 100 U/ml), à raison de 0,1ml par boîte de Pétri. Après incubation à 25°C, les colonies développées sont dénombrées, examinées au microscope et isolées pour détermination ultérieure. Nous avons contrôlé que les lavages supplémentaires avec ou sans détergent n'amenaient aucune amélioration du procédé.

On remarquera la similitude de ce dispositif avec ceux utilisés par les écologistes étudiant la végétation de divers écosystèmes (Gounot, 1969); il

peut être considéré comme un prélèvement en ligne et traité statistiquement comme tel.

RÉSULTATS

Inventaire des espèces isolées

Nous avons obtenu près de 1.500 isolats représentant 47 espèces différentes de champignons filamenteux et 36 espèces de levures. La liste de ces champignons figure aux Tableaux 1 et 2.

Tableau 1 - Inventaire des champignons filamenteux isolés de la carposphère des pommes à cidre. La nomenclature suivie est celle de la "List of cultures" 31e édit. du C.B.S. (1987).

Table 1 - List of filamentous fungi isolated from the carposphere of cider apples. The nomenclature used is that of the "List of cultures" 31st edit., C.B.S. (1987).

Acremonium sp.
Alternaria alternata (Fr.) Keissler
Alternaria tenuissima (Kunge) Wiltshire
Alternaria sp.
Arthrinium phaeospermum (Corda) M.B. Ellis
Ascochyta piricola Sacc.
Aspergillus flavus Link
Botrytis cinerea Pers.
Chaetophoma sp.
Cladosporium cladosporioides (Fres.) de Vries
Cladosporium herbarum (Pers.) Link
Cladosporium macrocarpum Preuss
Cladosporium sphaerospermum Penzig
Diaporthe perniciosa El. et Em. Marchal (anam.: *Asposphaeria pomi* Sacc. et Schulz.)
Epicoccum purpurascens Ehrenb.
Fusarium avenaceum (Corda) Sacc.
Fusarium culmorum (W.G. Smith) Sacc.
Fusarium graminearum Schwabe
Fusarium oxysporum Schlecht.
Fusarium verticillioides (Sacc.) Nirenberg
Mucor hiemalis Wehmer
Mucor racemosus Fres.
Nigrospora oryzae (Berk. et Br.) Petch
Penicillium canescens Sopp
Penicillium corylophilum Dierckx
Penicillium expansum Link
Penicillium funiculosum Thom
Penicillium janthinellum Biourge
Penicillium olsonii Bain. et Sartory
Penicillium oxalicum Currie et Thom
Penicillium paxilli Bain.
Penicillium purpurescens (Sopp) Raper et Thom
Penicillium thomii Maire
Penicillium sp. (série fellutana)
Penicillium sp. (série glabra)
Penicillium sp. (série miniolutea)
Penicillium sp. (série oxalica)
Phoma glomerata (Corda) Wollenw. et Hochapfel
Phoma sp.
Sphaeronaema sp.
Rhizopus stolonifer (Ehrenb.) Vuill.
Sporormia minima Auersw.
Trichoderma harzianum Rifai
Trichothecium roseum (Pers.) Link
Ulocladium consortiale (Thüm) Simmons
Verticillium dahliae Kleb.
Mycélium stérile

Tableau 2 - Inventaire des levures isolées de la carposphère de pommes à cidre. La nomenclature suivie est celle de Barnett & al. (1983).

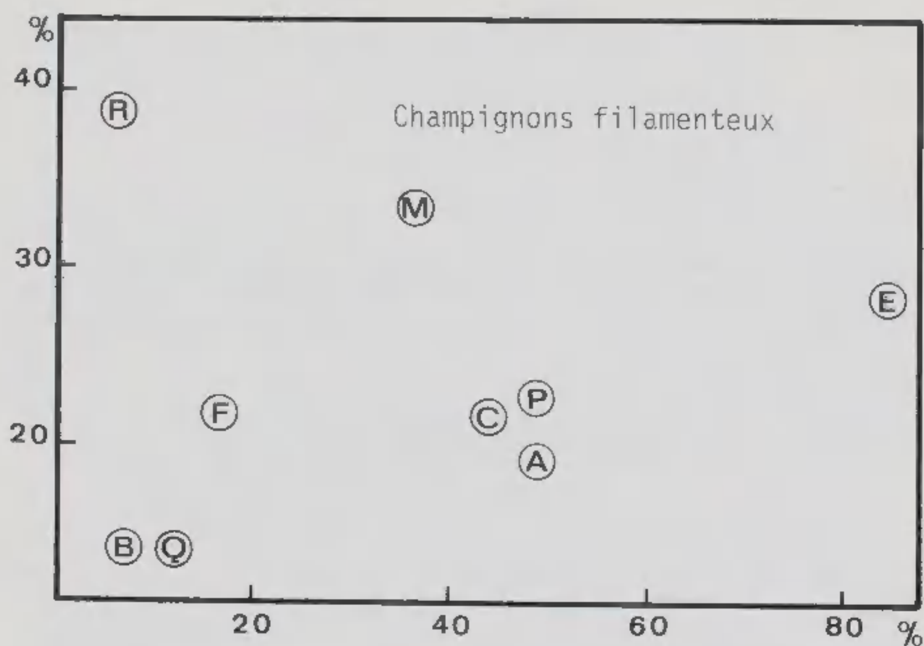
Table 2 - List of yeasts isolated from the carposphere of cider apples. The nomenclature used is that of Barnett & al. (1983).

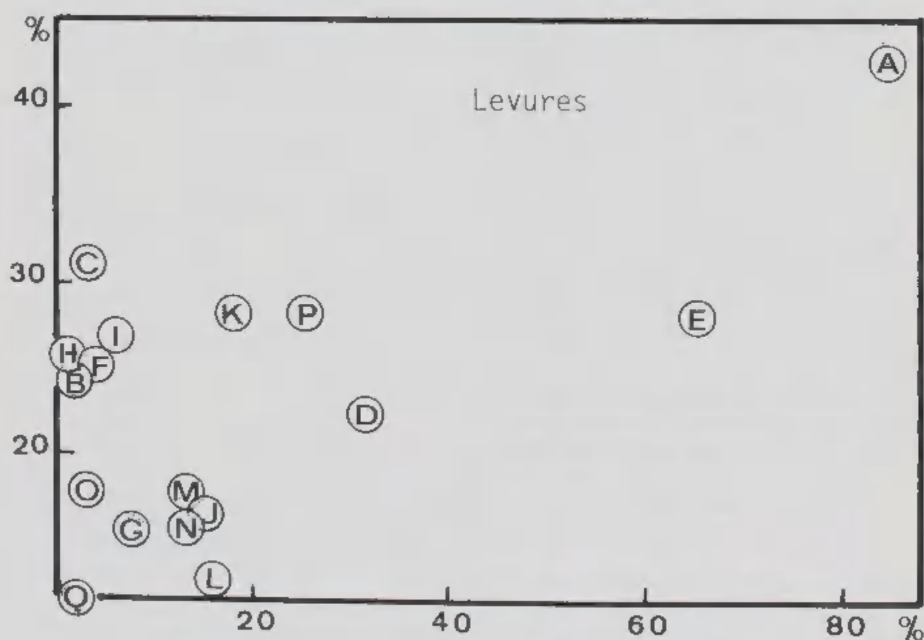
Levures "rouges"
Cryptococcus hungaricus (Zsolt) Phaff et Fell
Cryptococcus podzolicus (Bableva et Reshetova) Golubev
Metschnikowia pulcherrima Pitt et Miller
Rhodosporidium infirmo-miniatum Fell et al.
Rhodotorula acheniorum (Buhagiar et Barnett) Rodr. Miranda
Rhodotorula glutinis (Frs.) Harrison
Rhodotorula minuta (Saito) Harrison
Rhodotorula pallida Lodder
Rhodotorula pilimanae Hedrick et Burke
Sporidiobolus salmonicolor Fell et Statzell Tallman
Sporobolomyces puniceus (Komagata et Nakase) Ahearn et Yarrow
Sporobolomyces roseus Kluyver et van Niel

Levures "blanches"
Arthroascus javanensis (Klöcker) v. Arx
Candida baccarum (Buhagiar) Meyer et Yarrow
Candida cariosilignicola Lee et Komagata
Candida fragariarum (Barnett et Buhagiar) Meyer et Yarrow
Cryptococcus albidus (Saito) Skinner
Cryptococcus flavus (Saito) Phaff et Fell
Cryptococcus humicola (Daszewska) Golubev
Cryptococcus laurentii (Kuff.) Skinner
Cryptococcus terreus di Menna
Debaryomyces hansenii (Zopf) Lodder et Kreger van Rij
Filobasidiella neoformans Kwon-Chung
Hanseniaspora uvarum (Niehaus) Shehata et al.
Hansenula anomala (Hansen) H. et P. Sydow
Hansenula subpelliculosa Bedford
Pichia guillermondii Wickerham
Pichia halophila Shifrine et Phaff
Pichia membranaefaciens Hansen
Pichia salictaria Phaff et al.
Trichosporon beigelii (Küchenmeister et Rabenh.) Vuillemin
Trichosporon pullulans (Lindner) Diddens et Lodder
Williopsis saturnus (Kloecker) Zender

Levures "noires"
Aureobasidium pullulans (de Bary) Arnaud
espèce non identifiée I
espèce non identifiée II

Dans cette liste, les champignons polymorphes communément désignés sous le vocable "levures noires" ont été répertoriés avec les levures, étant le plus souvent isolés en même temps qu'elles. L'espèce *Aureobasidium pullulans* y est la plus fréquente et la plus abondante; deux autres espèces (mentionnées I et II) n'ont pu être identifiées: elle étaient peu fréquentes,


%
40
30
20
Champignons filamenteux
R
M
E
F
P
C
A
B
Q
20
40
60
80
%


%
40
30
20
Levures
A
C
K
P
E
I
H
F
B
D
O
M
J
G
N
L
Q
20
40
60
80
%

caractérisées par la production d'un exopigment noir diffusant dans le milieu gélosé et leur maintien en culture n'a pu être obtenu.

Signalons en outre que deux levures, peu fréquentes, n'ont pu être rattachées aux espèces décrites dans l'ouvrage de Barnett & al. (1983): leur auxanogramme est celui de *Cryptococcus albidus* mais l'une forme des arthrospores, l'autre des cellules très allongées.

Abondance relative des diverses espèces

La figure 2 permet une analyse rationnelle de l'abondance relative des diverses espèces. Le graphique du haut se rapporte aux champignons filamenteux, celui du bas aux levures. A chaque espèce mise en évidence correspond un emplacement défini:

- en abscisses, par le pourcentage de pommes à partir desquelles l'espèce est isolée,

- en ordonnées, par le pourcentage moyen de sites par pomme dans lesquels l'espèce est isolée.

On peut distinguer quatre groupes de champignons.

1) Les espèces "dominantes", présentes sur la plupart des fruits et dans la plupart des prélèvements de chaque pomme: *Aureobasidium pullulans*, *Epicoccum purpurascens* et *Cryptococcus laurentii*.

Figure 2 - Abondance relative des principales espèces fongiques mises en évidence. Abscisses = pourcentage de pommes à partir desquelles l'espèce a été isolée. Ordonnées = pourcentage moyen de sites par pomme dans lesquels l'espèce a été isolée.
En haut: champignons filamenteux (A = *Alternaria alternata*, B = *Botrytis cinerea*, C = *Cladosporium cladosporioides*, E = *Epicoccum purpurascens*, F = *Fusarium* (toutes espèces confondues), M = *Mucor hiemalis*, P = *Penicillium* (toutes espèces confondues), Q = *P. funiculosum*, R = *P. expansum*). En bas: levures (A = *Aureobasidium pullulans*, B = *Candida baccarum*, C = *C. cariosilignicola*, D = *Cryptococcus albidus*, E = *C. laurentii*, F = *C. podzolicus*, G = *Debaryomyces hansenii*, H = *Hanseniaspora uvarum*, I = levure noire I, J = *Pichia halophila*, K = *Metschnikowia pulcherrima*, L = *Rhodotorula glutinis*, M = *R. minuta*, N = *Sporobolomyces puniceus*, O = *S. roseus*, P = *Sporodiobolus salmonicolor*, Q = *Williopsis saturnus*).

Figure 2 - Relative abundance of the main fungal species. X axis = percentage of apples from which the species has been isolated. Y axis = mean percentage of localization on apples from which the species has been isolated.
Upper diagram: filamentous fungi, lower diagram: yeasts.

2) Des espèces qu'on peut qualifier d'"endémiques", isolées d'un grand nombre de fruits, mais sur peu de sites par pomme; tel est le cas de *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides*.

3) Des espèces "erratiques" présentes en forte densité sur quelques échantillons; ce sont par exemple des espèces à thalles filamenteux étendus, comme *Mucor hiemalis*, *Penicillium expansum* ou des espèces n'apparaissant que ponctuellement dans un verger.

4) Des espèces "rares"; elles ne se développent que sporadiquement sur un petit nombre de pommes. C'est le cas des espèces mentionnées dans la partie gauche et basse des graphiques, mais encore de toutes celles qui n'ont pas été figurées.

Influence de la variété de pommes et du verger

Les différences entre les populations fongiques isolées des deu cultivars de pommiers étudiés ne sont guère significatives. Tout au plu avons-nous constaté que "Douce Coetligne" héberge un peu plus *Cladosporium cladosporioides* que "Loccart vert"; c'est d'ailleurs une varie de moins bonne conservation et sensible aux pourritures lenticellaires.

L'influence des pratiques culturales (conduites en basse tige ou en ha te tige) apparaît négligeable pour les espèces dominantes; elle ne se manife te que pour quelques espèces erratiques ou rares.

Dynamique des populations fongiques en fonction de l'année et de la date récolte

La comparaison des résultats acquis en 1988 avec ceux de l'ann précédente ne fait pas apparaître de différences importantes (Fig. 3). On peut noter:

1) pour les champignons filamenteux :

- une légère augmentation de l' *Epicoccum purpurascens*, du *Clado sporium cladosporioides* et des *Penicillium*,

- une constance dans les populations d' *Alternaria* (avec cependant un peu plus d' *A. tenuissima* en 1987), de *Botrytis cinerea* et des *Mucor*,

- une diminution nette des *Fusarium*,

- la disparition complète en 1988 de l' *Acremonium* sp. et du *Rhizopus stolonifer*; ces espèces, assez fréquentes en septembre 1987, l'étaient beaucoup moins plus tard;

2) pour les levures :

- une légère augmentation de la plupart des levures rouges mais, par contre, une forte diminution du *Metschnikowia pulcherrima*,

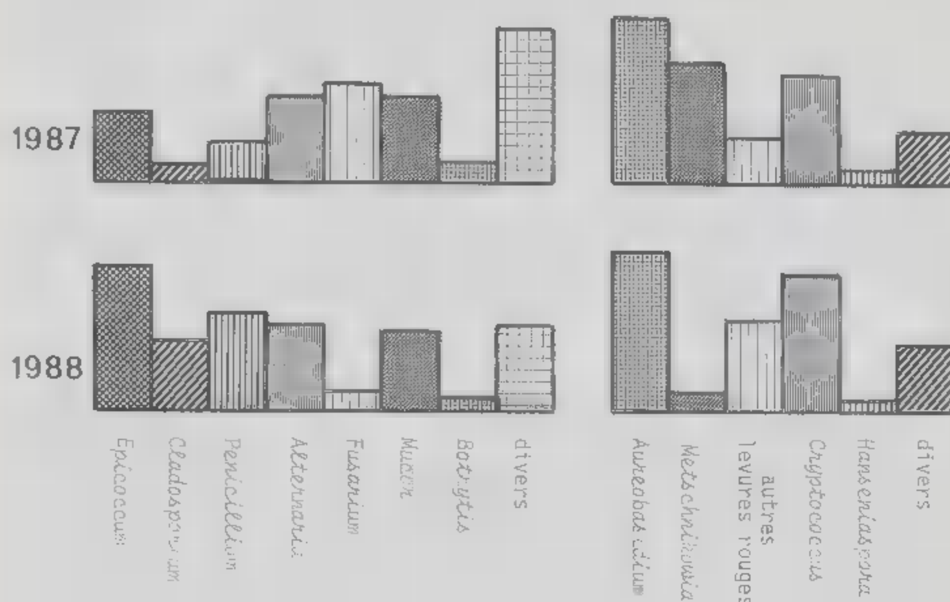


Figure 3 - Comparaison de l'abondance relative des principales espèces isolées en 1987 et en 1988.

Figure 3 - Comparison of the relative abundance of the main species isolated in 1987 and 1988.

- un faible accroissement des *Cryptococcus albidus* et *C. laurentii*.
- une très légère diminution de l' *Hanseniaspora uvarum*,
- une constance de l' *Aureobasidium pullulans*.

Les récoltes de pommes soumises à notre examen se sont échelonnées du 15 septembre au 15 novembre.

La population totale de champignons filamenteux, reflétée par le nombre d'isolats obtenus du début à la fin de la campagne de récolte, est à peu près constante quel que soit le verger concerné (environ 130 isolats pour 100 sites étudiés). Cependant, un examen attentif permet d'observer une tendance à l'augmentation pour les *Fusarium* du groupe *roseum* et les *Penicillium* tandis que les *Mucor* sont en diminution.

En ce qui concerne les levures, malgré certaines fluctuations d'un échantillon à l'autre, on peut confirmer les observations de Last & Price (1969) relatives à la phyllosphère: la fin de l'été et l'automne sont des

époques où la population totale diminue; on dénombre 7.000 ± 2.000 cellules de levures par cm² d'épiderme en septembre et seulement 1.500 ± 100, en novembre.

Tandis que l'année 1987 était marquée par une diminution relative (en proportion par rapport aux autres espèces), de septembre à novembre, de l' *Aureobasidium pullulans* et du *Metschnikowia pulcherrima* (Bizeau & al., 1989) en 1988 on note surtout une augmentation relative des levures rouges et des *Cryptococcus*.

DISCUSSION ET CONCLUSION

La carposphère des pommes à cidre étudiées comporte de nombreuses espèces fongiques. Trois d'entre elles sont largement dominantes: *Aureobasidium pullulans*, *Epicoccum purpurascens* et *Cryptococcus laurentii*. Les autres espèces, beaucoup moins représentées, appartiennent essentiellement aux genres *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium* et *Penicillium* d'une part, aux *Cryptococcus* et genres voisins ainsi qu'au groupe des levures "rouges" *Rhodotorula* et *Sporidiobolus* d'autre part.

Il s'agit de champignons dont les organes de dispersion sont déposés à la surface des fruits au gré des vents ou des eaux de ruissellement et, pour la plupart, ils sont communs au niveau de la phyllosphère (Davenport, 1976; Fokkema & van den Heuvel, 1986).

Les variations observées au cours de deux campagnes fruitières d'un verger à l'autre ou en fonction des conditions culturales présentent une faible amplitude. Les deux variétés de fruits possèdent des structures superficielles très proches comparées à celles des feuilles de végétaux variés. Les conditions climatiques (notamment l'humidité et la pollution atmosphérique) accusées de jouer un rôle important dans la phyllosphère (Dowding, 1986) n'ont pas ici marqué de différences significatives. Il en est de même des traitements pesticides éventuels dont le rôle mériterait des observations plus précises.

Parmi les champignons filamenteux détectés dans la carposphère, figurent des agents actifs d'altération des fruits (*Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium* variés, Mucorales): ils y végètent et leur mycélium est prêt à envahir les pommes à la moindre blessure ou meurtrissure, voire dès que s'amorcera la sénescence (Moreau & al., 1981). Plusieurs espèces sont réputées aptes à élaborer des mycotoxines (patuline du *P. expansum*, trichothécènes et autres métabolites des *Fusarium*) et présentent un risque de pollution des jus de fruits; ce risque peut d'ailleurs être modulé par la fermentation.

Parmi les levures mises en évidence, il est étonnant de ne rencontrer que très peu d'espèces utiles aux industries de transformation des pommes.

Par exemple, aucune souche de *Saccharomyces* n'est présente. *Hansenula anomala, Pichia guilliermondii* et *Pichia membranaefaciens* ne sont que très peu représentées. *Debaryomyces hansenii* et *Williopsis saturnus* qui peuvent exister dans le jus de pomme (Michel & al., 1988) sont un peu plus fréquentes mais appartiennent encore au groupe des levures rares. Seul, le *Metschnikowia pulcherrima*, quelque peu représenté ici, est apte à faire fermenter le glucose; il se maintient quelque temps dans le jus de pomme en fermentation. Signalons que nous avons isolé l' *Hanseniaspora uvarum* de la carposphère des pommes examinées; or c'est une espèce voisine, l' *H. valbyensis*, qui intervient dans la préparation du cidre (Michel & al., 1988).

On peut ainsi affirmer que la mycoflore de fermentation nécessaire à la préparation du cidre n'est vraiment pas naturellement présente sur l'épiderme des pommes, contrairement à ce qui se passe dans le cas du raisin (Belin & Henry, 1972). Pour assurer une bonne régularité dans la qualité du cidre, pour obtenir d'agréables caractères organoleptiques liés à une association de composés volatils élaborés par plusieurs espèces de levures, on peut sans doute tenter de favoriser le développement des espèces déjà spontanément présentes sur les fruits. Cela paraît hasardeux étant donné la faible quantité d'espèces initiatrices de fermentations intéressantes recensées. Il semble plus judicieux d'ensemencer le moût de pommes par des levures présélectionnées au laboratoire; ainsi sera mieux maîtrisée la fermentation.

La mycoflore de la carposphère des pommes à cidre n'est cependant pas sans intérêt. Par exemple, l' *Aureobasidium pullulans*, assez abondant dans nos isolements, permet de valoriser les déchets de zestes d'orange en produisant de la polygalacturonase (Petruccioli & al., 1989); ce même champignon élabore aussi de la glucoamylase (Frederici & al., 1989). On pourrait tenter d'utiliser de telles enzymes dans des processus de dégradation de polymères ou d'oxydation dont le rôle est primordial dans l'extraction et la clarification des jus de pomme. Ainsi, même si la microflore fongique spontanée de la carposphère des pommes à cidre semble incapable, à elle seule, d'assurer la préparation rationnelle d'une boisson fermentée, elle pourrait apporter divers éléments utiles et faciliter certaines étapes de cette fabrication.

BIBLIOGRAPHIE

BARNETT J.A., PAYNE R.W. and YARROW D., 1983 - *Yeasts, characteristics and identification.* London, Cambridge Univ. Press, 811p.

BEECH F.W. and DAVENPORT P.R., 1970 - The role of yeasts in cider making. *In*: A.H. ROSE & J.S. HARRISON, *The yeasts.* N.Y. & London, Academic Press, III: 73-146.

BELIN J.M. et HENRY P., 1972 - Contribution à l'étude écologique des levures dans le vignoble. Répartition des levures à la surface du pédicelle et de la baie de raisin. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.*, Ser. D, 274: 2318-2320.

BIZEAU C., PONCHANT D. & MOREAU M., 1989 - Evolution of yeast flora on cider apple in Brittany. *Yeast* 5 (special issue): 491-494.

CENTRAALBUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES, 1987 - List of cultures, 31e édit., Baarn, Delft, CBS: 420p.

DAVENPORT R.R., 1976 - Ecological concepts in studies of microorganisms on aerial plant surfaces. *In*: C.H. DICKINSON & T.F. PREECE, *Microbial of aerial plant surfaces*. N.Y. & London, Academic Press: 200-202.

DOWDING P., 1986 - Leaf yeasts as indicators of air pollution. *In*: N.J. FOKKEMA & J. VAN DEN HEUVEL, *Microbiology of the phyllosphere*. London, Cambridge Univ. Press: 121-136.

FOKKEMA N.J. and VAN DEN HEUVEL J., 1986 - *Microbiology of the phyllosphere*. London, Cambridge Univ. Press, 392p.

FREDERICI F., MILLER M.W. and PETRUCCIOLI M., 1989 - Semicontinuous production of glucoamylase using immobilized growing cells of *Aureobasidium pullulans*. *Yeast* 5 (special issue): 175-179.

GOUNOT M., 1969 - *Méthodes d'étude quantitative de la végétation*. Paris, Masson, 314p.

LAST F.T. and PRICE D., 1969 - Yeasts associated with living plants and their environs. *In*: A.H. ROSE & J.S. HARRISON, *The yeasts*. N.Y. & London, Academic Press, I: 183-218.

MICHEL A., BIZEAU C. et DRILLEAU J.F., 1988 - Etude de la flore levurienne présente dans les cidreries de l'ouest de la France. *Science des Aliments* 8: 359-368.

MOREAU C. et MOREAU M., 1960 - Les efflorescences mycéliennes sur fruits. *Fruits* 15: 239-241.

MOREAU C., MOREAU M., BOMPEIX G. et MORGAT F., 1965 - Recherches sur la maladie des "taches lenticellaires" de la pomme Golden. *Fruits* 20: 463-473.

MOREAU C., MOREAU M., BOMPEIX G. et MORGAT F., 1966 - Recherches sur la maladie des "taches lenticellaires" de la pomme Golden. *Fruits* 21: 467-488.

MOREAU C., QUELLEC F. et DRILLEAU J.F., 1981 - Altérations fongiques des pommes destinées aux industries de transformation. *Mycopathologia* 75: 165-168.

PETRUCCIOLI M., MONTELEONE E. and FREDERICI F., 1989 - Optimization of polygalacturonase production by *Aureobasidium pullulans* on orange pell waste. *Yeast* 5 (special issue): 157-161.

Cryptogamie, Mycol. 1990, 11 (1): 13-20

KERATINOPHILIC FUNGI ASSOCIATED WITH HORSE HOOFS IN EGYPT

Khyria M. ABDEL-GAWAD

Botany Department, Faculty of Science,
Assiut University, Assiut, Egypt.

ABSTRACT - The frequency of occurrence of keratinophilic fungi in 26 samples of hoofs (26 horses) collected from different localities at Assiut governorate were determined by using the soil plate technique. Twenty species which belong to 14 genera were collected: *Trichophyton equinum* was the most prevalent, *Chrysosporium tropicum* was isolated in moderate frequency, but in low frequencies keratinophilic and several species of non-keratinophilic fungi were isolated. At 45°C, on YPSs medium, 16 species belonging to 15 genera of thermophilic and thermotolerant fungi were isolated from 60 hoof samples: *Aspergillus* was the genus most commonly recovered. Among the true thermophilic fungal species, *Talaromyces thermophilus*, *Malbranchea sulfurea* and *Thermomyces laguninosus* occurred in low incidence. Several species of thermophilic and thermotolerant fungi were of rare occurrence.

RÉSUMÉ - 20 espèces (14 genres) de champignons kératinophiles ont été isolées sur 26 sabots de cheval provenant de différentes localités (Governorat d'Assiut). *Trichophyton equinum* est l'espèce la plus fréquente, suivie par *Chrysosporium tropicum*. A 45°C, sur milieu YPSs, 16 espèces (15 genres) de champignons thermophiles et thermotolérants ont été isolées à partir de 60 échantillons de sabots de cheval: *Aspergillus* est le genre le plus fréquent. Parmi les espèces thermophiles vraies, *Talaromyces thermophilus*, *Malbranchea sulfurea* et *Thermomyces lanuginosus* ont une faible fréquence.

KEY WORDS : keratinophilic fungi, thermophilic fungi, thermotolerant fungi, horse hoofs.

INTRODUCTION

The occurrence of dermatophytes and other keratinophilic fungi from animal hoofs has not been examined extensively although they are known to occur from the hair or skin of mammals (Ajello, 1959; Otcenasek & Dvorak, 1962; Rees, 1967; Scott & al., 1980; Aho, 1983; Marsella & al., 1985; Kuttin & al., 1986) and in Egypt (Bagy & Abdel-Hafez, 1985; Bagy, 1986). Others

studies have been performed on ringworm and horses infected by dermatophytes (de Vroey & al., 1983; Aho & Soveri, 1984; Aho & Skutnabb, 1984; Connole & Pascoe, 1984; Weiss & al., 1984; Elmula & Idris, 1985; Vrazal & al., 1985). Hence the aim of this investigation is to study the incidence of these fungi on horse hoofs.

MATERIALS AND METHODS

Twenty-six hoof samples from 26 horses were collected from different localities at Assiut governorate. These samples were placed in clean plastic bags and transferred immediately to the laboratory. The hoof samples were dissected into small pieces and 5 pieces from each sample were placed in 5 sterilized Petri dishes with double sterilized soil (autoclaving at 121°C for 30 min.) moistened with sterile distilled water, remoistened whenever necessary, and incubated at 26°C for up to 8 weeks. The moulds which appeared on the baits were transferred to the surface of Sabouraud's dextrose agar medium (Moss & McQuown, 1969) supplemented with 40 μg/ml streptomycin, 20 units of Penicillin/ml (SSA) and 0.05% cycloheximide (Actidione). The plates were incubated at 28°C for 2 weeks and the growing fungi were examined, isolated and identified.

To examine thermophilic fungi, 60 hoof samples were used with the same method of soil plate technique, but plates were incubated at 45°C and medium YPSs was used for isolation (g/l: water tap 1/4, distilled 3/4; yeast extract, 4.0; K_2HPO_4, 1.0; $MgSO_4.7H_2O$, 0.5; soluble starch, 12.0; agar, 20.0. Rose bengal (66 ppm) was added as a bacteriostatic agent (Smith & Dawson, 1944). Eight plates were used for each sample and the plates were examined after 7 days of incubation at 45°C. The developing fungi were identified and counted.

RESULTS AND DISCUSSION

Twenty species belonging to 14 genera were collected from horse hoofs (Tab. 1). *Trichophyton equinum* was the most common species on the horse hoofs (57.7% of the samples). *Trichophyton equinum* was previously reported as a cause of tinea corporis in man and a cause of ringworm in animals, particularly in horses. Colony appeared to be white and fluffy but later velvety with central folding and cream to tan in colour. Reverse is yellow to reddish brown. Macroaleuriospores are rare and they are slightly clavate, smooth and thin-walled, 3-4 celled. Microaleuriospores are abundant, slightly clavate to elongate, or nearly spherical, single-celled and either sessile or borne on short, delicate conidiophores. Chlamydospores are abundant in old cultures. It was also isolated from horses with ringworm by Vrazal & al. (1985) and studied on dermatophytoses in horses by Garcia & al. (1981), Aho & Soveri (1984) and Zakopal (1985).

Table 1: Numbers of cases of isolation (NCI out of 26 samples) and percentage counts (%) of various genera and species recovered from horse hoofs on Sabouraud's medium at 25°C.

Tableau 1: Genres et espèces de champignons isolés à partir de 26 échantillons de sabots de cheval, sur milieu Sabouraud à 25°C.

Genera and species	NCI	%	O.R.
Trichophyton equinum (Matruchot & Dassonville) Goedelst	15	57.7	H
Chrysosporium tropicum Carmichael	11	42.3	M
C. keratinophilum (Frey) Carmichael	4	15.4	L
C. georgii (Varsavsky & Ajello) Van Oorshot	1	3.9	R
C. merdarium (Link ex Grev.) Carmichael	1	3.9	R
C. pannicola (Corda) Van Oorschot et Stalpers	1	3.9	R
Myceliophthora vellerea (Sacc. & Speg.)	2	7.7	R
Geotrichum candidum Link ex Leman	1	3.9	R
Aspergillus flavus Link ex Fries	5	19.2	L
A. terreus Thom	2	7.7	R
A. sydowi (Bainier et Sartory) Thom et Church	1	3.9	R
Acremonium sp.	4	15.4	L
Fusarium solani (Mart.) Sacc.	2	7.7	R
Trichothecium roseum Link	2	7.7	R
Alternaria alternata (Fr.) Keissler	1	3.9	R
Cladosporium herbarum (Pers.) Link ex Fr.	1	3.9	R
Mucor sp.	1	3.9	R
Penicillium chrysogenum Thom	1	3.9	R
Paecilomyces lilacinus (Thom) Samson	1	3.9	R
Scopulariopsis brevicaulis (Saccardo) Bainier	1	3.9	R
Yeast-like	3	11.5	L

O.R. = occurrence remarks: H = high occurrence, between 13-26; M = moderate occurrence, between 6-12; L = low occurrence, between 3-5; R = rare occurrence, between 1-2.

Chrysosporium tropicum was the second most frequent fungal species (42.3% of the samples). It was also isolated by Bagy & Abdel-Hafez (1985) from camel and goat hairs and from dog, donkey and cow hairs (Bagy, 1986). It was also isolated from mammals by Rees (1967), Moraes & al. (1967) and Gugnani & al. (1975).

A. flavus was the third dominant species (19.2% of the samples). It was also isolated by Bagy & Abdel-Hafez (1985) and Bagy (1986). *Chrysosporium keratinophilum* and *Acremonium* sp. were the fourth common species (15.4% of the samples). *C. keratinophilum* was the most common species on the hairs of goat and camel (Bagy & Abdel-Hafez, 1985) and was also found on dog, donkey and cow hairs (Bagy, 1986). It was isolated from mammals by Otcenasek & Dvorak (1962), Hoffman & al. (1970) and Gugnani & al. (1975). *Acremonium* sp. was also isolated by Filipello Marchisio (1986) from children's sandpits.

Among the group of *Chrysosporium*-like fungi the species isolated from the horse hoofs are the same mostly recovered from soils by Guarro & al. (1981) and Marsella & Mercantini (1986) and from Egyptian soils baited with different keratinaceous materials. Abdel-Fattah & al. (1982) showed that *C. indicum, C. tropicum* and *C. keratinophilum* were common in Egyptian soil baited with human hait, animal hair or pigeon feathers. Also, Maghazy (1983) isolated *C. tropicum, C. keratinophilum, C. indicum, C. pannicola* and *C. queenslandicum* from Egyptian soils baited with human hair, cow and buffalo hair and sheep wool. Also they were isolated from feathers of birds by Otcenasek & al. (1967), Sur & Ghosh (1979), and in Egypt, Bagy (1982) isolated *Chrysosporium* species from chicken's and wild sparrow's feathers and their nests.

Myceliophthora vellerea (Chrysosporium asperatum) isolated from horse hoofs, was commonly recovered in soil by Caretta & al. (1977). *Geotrichum candidum* was also isolated by Zaror (1979) which cause human nails infection. Yeasts, also isolated by Rippon (1982), and diverse filamentous fungi are referred collectively as onchomycosis.

Most of the other fungi recovered from the horse hoofs are common soil fungi in Egypt, frequently isolated by Moubasher and his collaborators on Czapek's agar.

These keratinophilic fungi which concentrated in the superficial layers of soil may become hoofs saprophytic or infections. The dispersal of these fungi in the air and incidence on animal skin or hair may cause infection; for example *Trichophyton equinum* which cause ringworm of horses was isolated by several authors; it was also isolated from the horse hoofs in this investigation.

At 45°C, 16 species belonging to 15 genera of thermophilic and thermotolerant fungi were isolated from the hoof samples (Tab. 2).

Aspergillus was the genus most commonly recovered (83% of total samples). Of the three *Aspergillus* species, *A. fumigatus* was of high incidence (72%) while *A. nidulans* was of low incidence (20% of the samples).

Among the true thermophilic fungal species, *Talaromyces thermophilus, Malbranchea sulfurea* and *Thermomyces lanuginosus* occurred in low incidence (21, 20 and 11% of total samples respectively).

Hyphae of *Malbranchea sulfurea* were colorless at first, later yellow, 1.5-4.5μm in diameter, the branches arising at right angles to the supporting hyphae, at first nonseptate, later becoming regularly septate and forming blocklike cells from the apex toward the base with thick-walled spores separated by thin-walled, sterile cells which soon die and collapse; spores pale yellow or colorless subcylindrical, often slightly curved as irregular, 3-7 x 3-4.5μm.

Table 2: Incidence (out of 60 samples) and % incidence of thermophilic and thermotolerant fungi recovered from horse hoofs on YPSs Agar medium at 45°C.

Tableau 2: Champignons thermophiles et thermotolérants isolés à partir de sabots de cheval sur milieu agar-YPSs, à 45°C.

Genera and species	Incidence	%	O.R.
Aspergillus	50	83	H
A. fumigatus Fres.	43	72	H
A. nidulans (Eidam) Wint.	12	20	L
A. terreus Thom	4	7	R
Talaromyces thermophilus Stolk	13	21	L
Malbranchea sulfurea (Miche) Sigler & Carm.	12	20	L
Thermomyces lanuginosus Tsi Kitnsky	7	11	L
Chaetomium thermophilus La Touche	6	10	R
Mucor sp.	5	8	R
Acremonium alabamensis Morgan-Jones	3	5	R
Myriococcum albomyces Cooney & Emerson	3	5	R
Paecilomyces inflatus (Burnside) Carmichael	2	3	R
Corynascus sepedonium Emmons	1	2	R
Humicola stellata Bunce	1	2	R
Rhizomucor pusillus Lindpt (Schipper)	1	2	R
Rhizopus stolonifer (Ehrenb. ex Fries) Lind.	1	2	R
Thermoascus thermophilus (Sopp) Von Arx	1	2	R
Torula thermophila Cooney & Emerson	1	2	R

Occurrence remarks: H = high occurrence, between 30-60; M = moderate occurrence, between 15-29; L = low occurrence, between 7-14; R = rare occurrence, between 1-6.

Hyphae of *Myriococcum albomyces* were colorless, branched, decumbent to erect, forming a loose mucedinous subiculum in culture; prostrate hyphae constricted at the septa, forming branched, chainlike series of cells that break apart easily, ascocarps superficial, 100-250μm diameter, globose, darkbrown, nonostiolate, wall glabrous, asci pyriform produced in one or more tufts from a group of central cells.

Paecilomyces inflatus has colonies floccose-funiculose, yellow and center faintly pink; reverse white becoming buff or faintly yellow. Conidiophores are usually lacking and phialides borne irregularly on aerial hyphae; phialides have a septum near the base and are usually inflated in the basal portion appearing flask-like in the upper portion to narrow apical tube, conidia sometimes develop irregularly, becoming lopsided or squared, distinctly lemon-shaped with slightly truncate base and apex with rounded point.

Hyphae of *Torula thermophila* were colorless, septate, 2-5μm broad; spores dark brown, smooth walled, translucent, generally globose, to oval, basipetally produced in chains on hyphal branches or developed intercalarily, colonies white at first, turning jet black. The rest of thermophilic and thermotolerant fungi were rare.

Most probably, the hoofs are infested with propagules of these fungi (spores or mycelial fragments) from the soil, the different types of feedstuffs distributed to the horses, the air or the air-dust mycoflora. These suggestions are based on the fact that all of the fungi recovered from the horse hoofs were previously recovered from Egyptian soils (Moubasher & al., 1981 a-b; Moharram, 1984), wheat and broad-straw, composts (Moubasher & al., 1982) and other sources.

REFERENCES

ABDEL-FATTAH H.M., MOUBASHER A.H. and MAGHAZY S.M., 1982 - Keratinolytic fungi in Egyptian soils. *Mycopathologia* 79: 49-53.

AHO R., 1983 - Saprophytic fungi isolated from the hair of domestic and laboratory animals with suspected dermatophytosis. *Mycopathologia* 83: 65-73.

AHO R. and SKUTNABB K., 1984 - *Microsporum equinum*- uuisn hevosen sieni-ihottuman aiheuttaja Suomessa. [= Equine dermatophytosis caused by *Microsporum equinum*]. *Sumen Eläinlääkarilehti* 90: 200-201, 203-204.

AHO R. and SOVERI T., 1984 - *Trichophyton eguinumin* aiheuttama sieni-ihottuma hevosella. [= Equine dermatophytosis caused by *Trichophyton equinum*]. *Sumen Eläinlääkarilehti* 90: 192-193, 195-197.

AJELLO L., 1959 - A new *Microsporum* and its occurrence in soil and on animals. *Mycologia* 51: 69-76.

BAGY M.M.K., 1982 - Some ecological and physiological studies on keratinolytic fungi associated with birds in Egypt. Ph. D. Thesis, Bot. Dept., Fac. Sci., Assiut Univ., Egypt.

BAGY M.M.K. and ABDEL-HAFEZ A.I.I., 1985 - Mycoflora of camel and goat hairs from Al-Arish, Egypt. *Mycopathologia* 92: 125-128.

BAGY M.M.K., 1986 - Fungi on the hair of large mammals in Egypt. *Mycopathologia* 93: 73-75.

CARETTA G., DEL FRATE G., PIONTELLI E. e TODARO F., 1977 - Distribuzione di funghi cheratinofili nel suolo del vulcano Enta (Sicilia). *Rivista Parassitol.* 38: 115-127.

CONNOLE M.D. and PASCOE R.R., 1984 - Recognition of *Trichophyton equinum* var. *equinum* infection of horses. *Austral. Veterin. J.* 61: 94.

DE VROEY C., WUYTACK-RAES C. and FOSSOUL F., 1983 - Isolation of saprophytic *Microsporum praecox* Rivalier from sites associated with horses. *Sabouraudia* 21: 255-257.

ELMULA A.F. and IDRIS U.E.A.A., 1985 - Ringworm in a horse caused by *Trichophyton verrucosum*. *Bull. Animal Health & Produc. Africa* 33: 17-18.

FILIPELLO MARCHISIO V., 1986 - Keratinolytic and keratinophilic fungi of children's sandpits in the city of Turin. *Mycopathologia* 94: 163-172.

GARCIA C., PLANAS A., CORDOVES CESPEDES C.O., DELGADO V. and CASANAS P.,1981 - [Preliminary report on the incidence of dermatophytes in

domestic animals]. Acad. Ci. Cuba Informe Cientifico-Tecnico No. 157: 1-4. in Span. with Span & Engl. summ. (from Biological Abstract: 75, 19290).

GUARRO J., PUNSOLA L. and CALVO M.A., 1981 - Keratinophilic fungi from soil of Tarragona, Catalunya. *Mycopathologia* 76: 69-71.

GUGNANI H.C., WATTAL B.L. and SANDHU R.S., 1975 - Dermatophytes and other keratinophilic fungi recovered from small mammals in India. *Mykosen* 18: 529-538.

HOFFMANN R., KOLIPP D. und KOCH H.A., 1970 - Die Bedeutung von Mäusen und anderen Kleinsäugern für die Verbereitung Von Dermatophyten und anderen Keratinophilen Pilzen. *Mykosen* 13: 353-387.

KUTTIN E.S., ALHANATY E., FELDMAN M., CHAIMOVITS M. and MÜLLER J., 1986 - Dermatophytosis of camels. *J. Med. Veterin. Mycol.* 24: 341-344.

MAGHAZY S.M., 1983 - Further studies on keratinolytic fungi in Egyptian soils. Ph. D. Thesis. Bot. Dept., Fac. Sci., Miniya Univ., Egypt.

MARSELLA R., MERCANTINI R., SPINELLI P. and VOLTERRA L., 1985 - Occurrence of keratinophilic fungi in animals of zoological park of Rome. *Mykosen* 28: 507-512.

MARSELLA R. and MERCANTINI R., 1986 - Keratinophilic fungi isolated from soil of the Abruzzo National Park, Italy. *Mycopathologia* 94: 97-107.

MOHARRAM A.M., 1984 - Studies on thermophilic and thermotolerant fungi in Egyptian soils. Ph. D. Thesis, Bot. Dept., Fac. Sci., Assiut Univ., Egypt.

MORAES M., BORELLI D. and FEO M., 1967 - *Microsporum amazonicum* nova species. *Med. Cutan.* 2: 281-286.

MOSS E.S. and MCQUOWN A.L., 1969 - *Atlas of Medical Mycology*. 3rd ed. Baltimore, Williams & Wilkins Comp.

MOUBASHER A.H., ABDEL-FATTAH H.M., ABDEL-HAFEZ S.I.I. and MOHARRAM A.M., 1981a - Studies on Egyptian Thermophilic soil fungi. I. Taxonomical and Environmental Studies. *Bull. Fac. Sci., Assiut Univ.* 10: 13-28.

MOUBASHER A.H., ABDEL-FATTAH H.M., ABDEL-HAFEZ S.I.I. and MOHARRAM A.M., 1981b - Studies on Egyptian thermophilic soil fungi II. Seasonal fluctuations of thermophilic soil fungi. *Bull. Fac. Sci., Assiut Univ.* 10: 29-40.

MOUBASHER A.H., ABDEL-FATTAH H.M., ABDEL-HAFEZ S.I.I. and MOHARRAM A.M., 1982 - Fungi of wheat and broad-bean straw composts. II. Thermophilic fungi. *Mycopathologia* 78: 169-176.

OTCENASEK M. and DVORAK J., 1962 - The isolation of *Trichophyton terrestre* and other keratinophilic fungi from small mammals of south eastern Moravia. *Sabouraudia* 2: 111-113.

OTCENASEK M., HUDEC K., HUBALEK Z. and DVORAK J., 1967 - Keratinophilic fungi from the nests of birds in Czechoslovakia. *Sabouraudia* 5: 350-354.

REES R.G., 1967 - Keratinophilic fungi from Queensland. I. Isolation from animal hair and scales. *Sabouraudia* 5: 165-172.

RIPPON J.W., 1982 - *Medical mycology*. Philadelphia, W.B. Saunders Comp.

SCOTT D.W., KIRK R.W. and BENTINCK-SMITH J., 1980 - Dermatophytosis due to *Trichophyton terrestre* infection in a dog and cat. *J. Amer. Animal Hospital Assoc.* 16: 53-59.

SMITH N.R. and DAWSON V.T., 1944 - The bacteriostatic action of rose bengal in media used for the plate count of soil fungi. *Soil Sci.* 58: 467-471.

SUR B. and GHOSH G.R., 1979 - Keratinophilic fungi from Orissa. I. Isolations from soils. *Sabouraudia* 18: 269-274.

VRAZAL V., RYBNIKÄR A., CHUMELA J. and LYSÁK J., 1985 - *Trichophyton equinum* -hlavni puvodce dermatophytóz ukorü. [= *Trichophyton equinum* -the main cause of ringworm in horses]. *Veterinärstvi* 35: 119-120.

WEISS R., FÖLDY I. and CHRISTOPH H., 1984 - *Trichophyton verrucosum* infektion bei pferden. [= *Trichophyton verrucosum* infection in horses]. *Tierärztliche praxis* 12: 49-53.

ZAKOPAL J., 1985 - Zvysit pozornost dermatofytózam ■ koni. [= Better attention to dermatophytoses in horses]. *Veterinärstvi* 35: 216-217.

ZAROR L., 1979 - Onicomicosis en Valdivia. [= Onychomycosis in Valdivia]. *Revista Med. Chile* 107: 558-559.

NOTAS MICOLOGICAS, I. *HEBELOMA VACCINUM* ROMAGN. Y *HEBELOMA VACCINUM* VAR. *CREMEOPALLIDUM* VAR. NOV.

F. ESTEVE-RAVENTOS y M. HEYKOOP

Dpto de Biologia Vegetal (Botánica),
Univ. de Alcalá de Henares, Madrid, Spain.

RESUMEN - Dedicamos un profundo estudio taxonómico, ecológico y bibliográfico sobre una rara especie del orden *Agaricales: Hebeloma vaccinum* Romagn. Observaciones realizadas con material procedente de Holanda y de 2 localidades madrileñas, han revelado suficientes diferencias toxonómicas para la creación del nuevo taxon: *H. vaccinum* var. *cremeopallidum*. Se añaden microfotografías realizadas al microscopio electrónico de barrido.

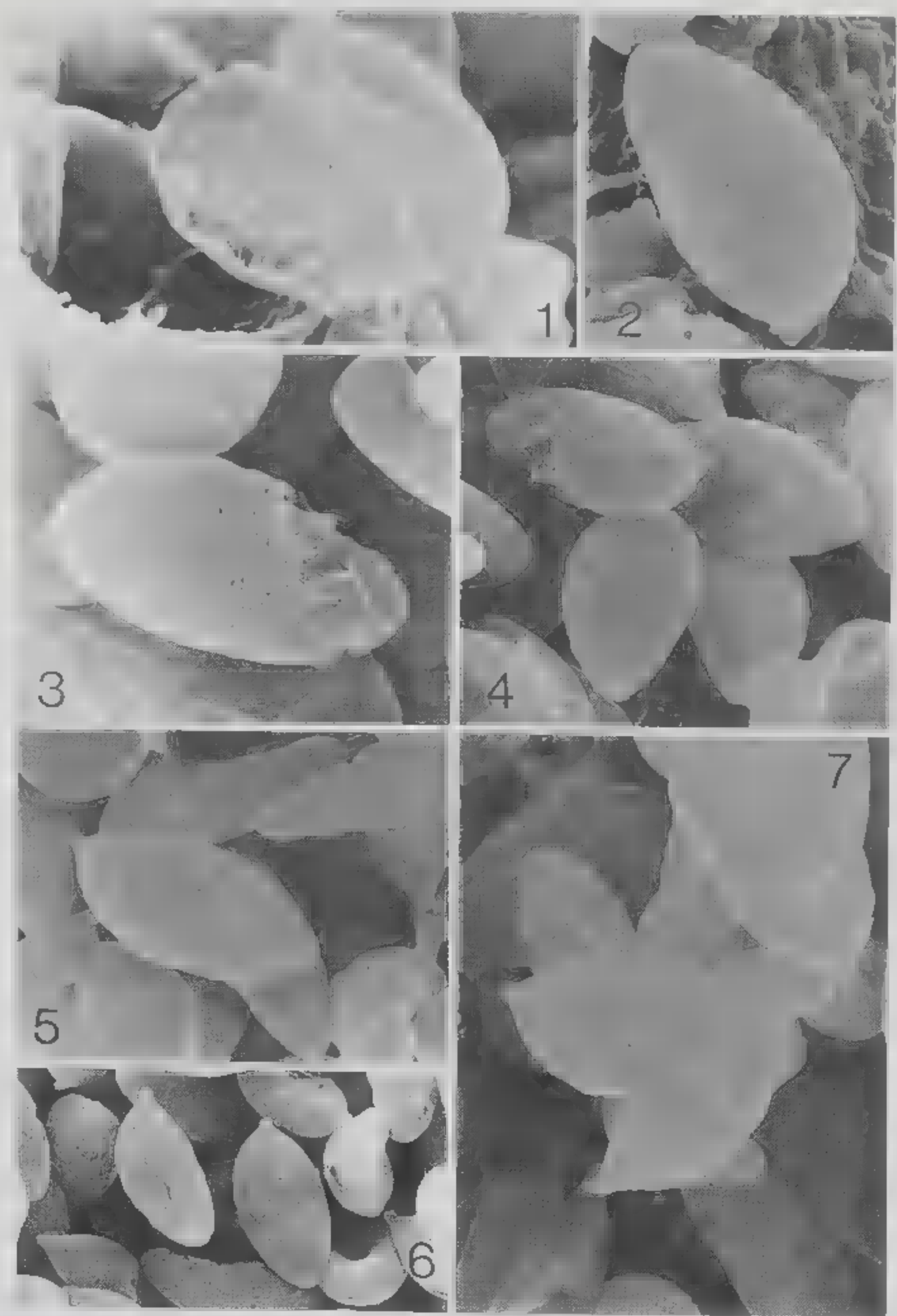
RÉSUMÉ - Étude taxonomique, écologique et bibliographique détaillée d'une espèce rare de l'ordre des Agaricales: *Hebeloma vaccinum* Romagn. Les observations réalisées sur du matériel provenant des Pays-Bas et de 2 localités de la province de Madrid ont montré des différences taxonomiques suffisantes pour la création du nouveau taxon: *H. vaccinum* var. *cremeopallidum*.

ABSTRACT - In this paper we make a taxonomic, ecological and bibliographical study on *Hebeloma vaccinum* Romagn. Collections examined from The Netherlands, as well as from 2 localities from the province of Madrid (Spain) have revealed that there is enough evidence to create the new variety *Hebeloma vaccinum* var. *cremeopallidum*.

MOTS CLÉS : Taxonomie, *Hebeloma*, *Cortinariaceae*, *Basidiomycotina*.

INTRODUCCION

El género *Hebeloma* Roze forma parte de la familia *Cortinariaceae* dentro del amplio grupo de los hongos *Agaricales* y está bien definido taxonómicamente por el color de su esporada, que varía desde los tonos marrón-tabaco a marrón-arcilloso, y por los caracteres esporales (morfología y ornementación) y ecológicos (formadores en su mayor parte de


1
2
3
4
5
6
7

ectomicorrizas). Los límites del género con los próximos *Hebelomina* Maire y *Alnicola* Kühner y sus caracteres morfológicos y ecológicos han quedado bien definidos por Singer (1986).

Es un dato curioso constatar cómo de un género casi cosmopolita en las áreas templadas del globo, aún desconozcamos monografías a un nivel superior al meramente local o bien continental, siendo el único trabajo de esta índole realizado en nuestro continente el de Bruchet (1970), pero en el que desgraciadamente sólo se recogen parte de los táxones europeos. Util es también la reciente aportación de Smith & al. (1983) sobre las especies provistas de velo (Sección *Indusiata* (Fr.) Jacq.) pero que abarca únicamente aquellos táxones encontrados en la parte occidental de Norteamérica.

De entre la treintena de especies que existen aproximadamente en el continente europea, una de ellas, *Hebeloma vaccinum*, llama poderosamente la atención por sus caracteres esporales únicos y es el objeto de este estudio.

MATERIAL Y METODOS

El material estudiado procede de una localidad holandesa y de 2 diferentes localidades de la provincia de Madrid. Este material, para el que se utilizaron como medios de observación microscópica el agua, solución amoniacal al 10% y solución de Rojo Congo amoniacal, ha sido depositado en el Herbario de Micología del Departamento de Biología Vegetal (Botánica) de la Universidad de Alcalá de Henares (H.AH), y se encuentra disponible para cualquier consulta o revisión.

Las medidas esporales han sido realizadas sin considerar el perisporio o caliptra. Las ilustraciones han sido realizadas a la escala indicada, y las fotografías al S.E.M. en un microscopio ISI modelo SX25.

Hebeloma vaccinum **Romagn.**, *Bull. Soc. Mycol. France* 81: 335-336 (1965), Fig. 1, 2 y 8.

La cita de Moreno (1980) de Riaza (Segovia), en humus de *Populus*, ha sido estudiada por nosotros y corresponde a otro taxon cuya identidad es difícil de precisar, ya que carece de los suficientes datos de campo, tanto

---

Fig. 1-2 - *Hebeloma vaccinum* Romagn. (H.AH 10.806): esporas al S.E.M. Fig. 3-7 - *Hebeloma vaccinum* var. *cremeopallidum* Esteve-Raventós & Heykoop (H.AH 9392); esporas al S.E.M.

Fig. 1-2 - *Hebeloma vaccinum* Romagn. (H.AH 10.806): spores under S.E.M. Fig. 3-7 - *Hebeloma vaccinum* var. *cremeopallidum* Esteve-Raventós & Heykoop (H.AH 9392): spores under S.E.M.

macroscópicos como organolépticos, como para poder ser identificado con precisión. Se trata de un carpóforo de tamaño medio-grande cuya coloración y esporas no se corresponden con *Hebeloma vaccinum* Romagn., principalmente por su perisporio adpreso.

El material procedente de Holanda concuerda perfectamente con la descripción original de Romagnesi (1965). Los caracteres más relevantes de esta especie y del material estudiado radican en la típica ornamentación esporal, con un perisporio envainante que se despega con facilidad de un episporio bien ornamentado y que rodea a toda la espora con excepción de la apícula, que queda libre. Se trata, según su autor, de una especie de tamaño medio-pequeño con un sombrero de color marrón-rojizo vivo, sobre todo en el centro, (que recuerda al de *Hebeloma truncatum* (Schaeff.: Fr.) Kummer), con una superficie viscosa de apariencia aceitosa, un estipe cilíndrico y blanco que se macula de amarillo-parduzco en la base con la manipulación, pruinoso en el ápice y sin restos de cortina. Las láminas poseen unas tonalidades marrón-ocráceas con un reflejo rojizo y exudan pequeñas gotas transparentes. Aparte de los caracteres de la ornamentación esporal ya mencionados, los cistidios marginales se muestran variables, desde cilíndricos hasta progresivamente claviformes e incluso sublageniformes, y la epicutis pileica, que se encuentra gelificada, no posee ningún carácter especial de entre los que presenta el género, con una hipocutis formada por elementos anchos y cortos de tipo pseudoparenquimatoso que aparece como carácter común en casi todas las especies de *Hebeloma*.

Las medidas esporales indicadas por Romagnesi (loc. cit.) son de 11-13 x 6-7,7µm (Q = L/l = 1,83-1,69). Las del material estudiado son de 11-12,5(-13) x 6,5-7,5µm (Q = L/l = 1,70-1,66) y poseen la morfología típica, anchamente amigdaliforme, illustrada en Romagnesi (1965: 334), en donde se aprecia un vientre amplio y redondeado en vista tanto frontal como lateral.

Material estudiado: Holanda, Bijimermeer, Amsterdam Zuid-Oost, en zonas húmedas entre *Poaceae* y humus de *Populus nigra* L., 28-VIII-87, M. Heykoop, H.AH 10806.

***Hebeloma vaccinum* Romagn. var. *cremeopallidum* Esteve-Raventós & Heykoop var. nov.,** Fig. 3-7 y 9-11.

A varietate typica differt sporis maioribus ((12,5-)13-16(-17) x (5,5-)6-7(-7,8) µm) et pileo albo pallido. Holotypus Pto. de Canencia, Madrid, entre hierba bajo *Salix atrocinera* Brot., 10-XI-85, *leg.* F. Esteve-Raventós, H.AH 9392.

Sombrero de 1,5-3cm de diámetro, desde convexo hasta aplanado en la madurez, de color uniforme crema-blanquecino hasta crema-ocráceo, sin tonos rojizos, con el margen regular y obtuso, luego recto al envejecer, de apariencia subhigrófana y con la superficie viscosa y brillante, como lacada

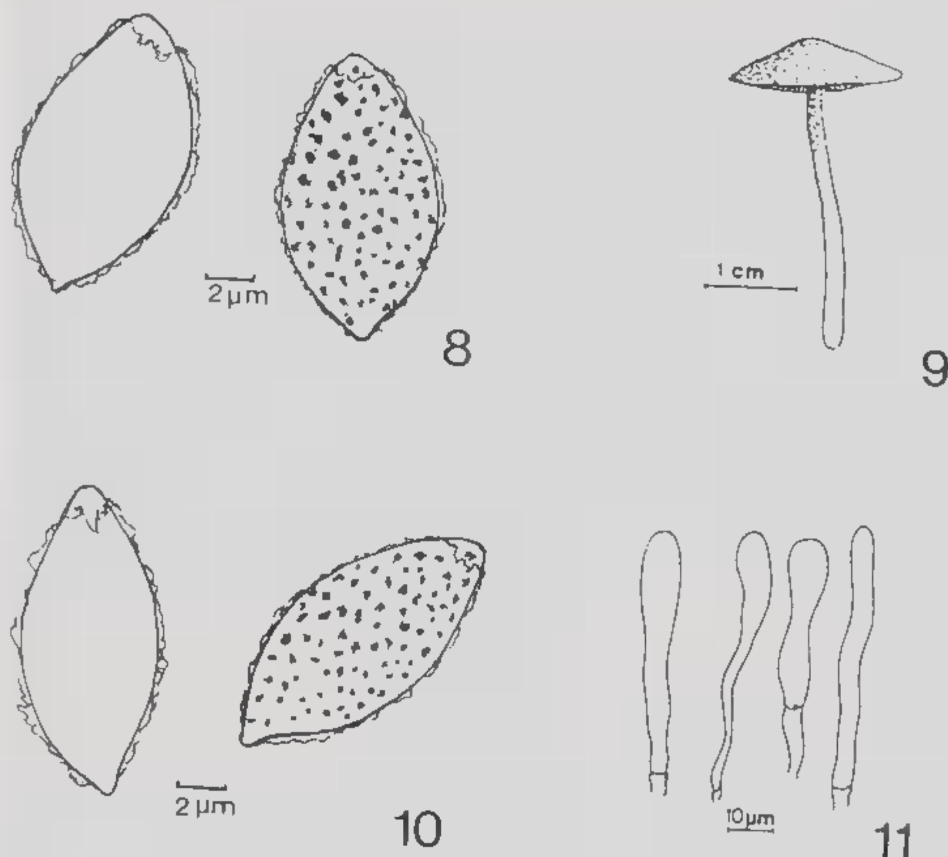


Fig. 8 - *Hebeloma vaccinum* Romagn. (H.AH 10.806): esporas. Fig. 9-11 - *Hebeloma vaccinum* var. *cremeopallidum* Esteve-Raventós & Heykoop (H.AH 9392); 9: basidiocarpo. 10: esporas. 11: queilocistidios.

Fig. 8 - *Hebeloma vaccinum* Romagn. (H.AH 10.806): spores. Fig. 9-11 - *Hebeloma vaccinum* var. *cremeopallidum* Esteve-Raventós & Heykoop (H.AH 9392); 9: carpophore. 10: spores. 11: cheilocystidia.

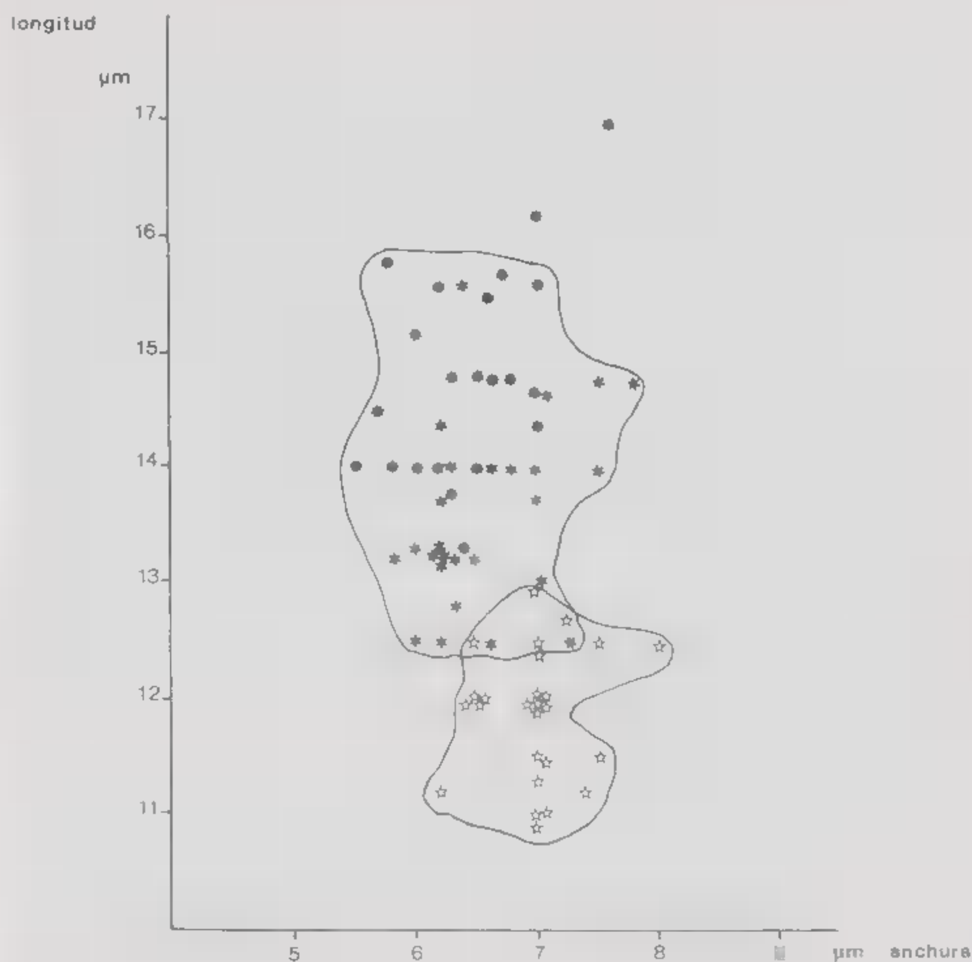
o barnizada. Pie de -3,5 x 0,3-0,5cm, cilíndrico, de color blanco pero tomando tonos parduzcos en la base al ser manipulado o al envejecer, con el ápice pruinoso y sin restos de velo visibles tanto en los carpóforos jóvenes como adultos. Láminas medianamente apretadas, de hasta 5mm de anchura, emarginadas, no ventrudas, de color café con leche con un patente reflejo rojizo, exudando pequeñas gotas hialinas en la arista, que es ligeramente floconosa. Carne blanca, olor a patata con un matiz dulzaino al corte, y sabor amarescente. Esporada marrón.

Esporas largamente amigdaliformes en su mayor parte, (12,5-)13-16(-17) x (5,5-)6-7(7,8)μm, Q (= L/l) ≥ 2, con un perisporio que se despega con facilidad de un episporio con ornamentación patente formando verrugas densas, a veces unidas, y con papila apical lisa. Basidios desde claviformes hasta cilíndricos, tetraspóricos, de 35-40 x 9-10,2μm. Cheilocistidios cilíndricos, ensanchándose paulatinamente hacia el ápice, de 40-66 x 7-11,2(-13,6)μm. Caulocistidios cilíndricos con ápice obtuso, a veces ligeramente claviformes, de 30-55 x 8-15μm. Epicutis formada por hifas filiformes, cilíndricas a levemente ensanchadas hacia el ápice, de 4-6μm de diámetro con pigmento intracelular amarillo, pasando progresivamente a una subcutis pseudoparenquimatosa formada por hifas anchas y cortas de hasta 30μm de diámetro. Trama laminal formada por artículos alargados, dispuestos regularmente de forma más o menos paralela y de hasta 10μm de anchura. Subhimenio formado por artículos muy cortos y ramificados de hasta 5μm de diámetro.

Material estudiado : Madrid. Puerto de Canencia, entre hierba bajo *Salix atrocinera* Brot., 10-XI-85, F. Esteve-Raventós, II.AH 9391. Inmediaciones del Embalse de Navalmedio, Cercedilla, en el margen de un riachuelo bajo *Salix atrocinera* Brot., 27-X-85, J.M. Barrasa & F. Esteve-Raventós, II.AH 9392.

DISCUSSION

Romagnesi (1965) describió *Hebeloma vaccinum* como una especie que recuerda en su coloración a *H. truncatum*, es decir, de un fuerte color marrón-rojizo en el píleo y, según los tamaños esporales por él indicados, el coeficiente longitud anchura de las esporas no supera el valor de 2. La morfología esporal por él illustrada nos presenta unas esporas anchamente amigdaliformes con un vientre ancho en su cara adaxial. Con posterioridad, Bruchet (1970: 84) hace una descripción similar a la de Romagnesi, indicando un tamaño esporal de (12)13-14(-16) x (6,5-)7-8(-8,5)μm, y, según se desprende de sus ilustraciones, con una morfología amigdaliforme-limoniforme prácticamente igual a la de Romagnesi; la coloración del sombrero es señalada "brune rousse foncée". Clémençon (1976) hace observaciones similares indicando unas esporas de 9,4-11(-13) x 5,7-6,8μm, es decir pequeñas y más bien anchas. Bohus (1978) lo cita para Hungría bajo *Populus*, pero sin hacer ninguna descripción sobre este material. Vesterholt (1986) hace referencia y describe una recolecta de Dinamarca encontrada bajo *Populus tremula* y otros caducifolios; ésta última se caracteriza por su sombrero rojizo-marrón y porte robusto. El tamaño indicado para las esporas es de 12-14 x 6,7-7,5μm con un contorno amigdaliforme y ancho. Por último, *Hebeloma brunneifolium*, especie descrita por Hesler (1977) de Norteamérica, nos parece próxima a *H. vaccinum* por sus esporas, y de la que se diferencia, según su autor, básicamente por la apreciable longitud de



☆ ***Hebeloma vaccinum*** H.AH 10.806
■ ***Hebeloma vaccinum* var. *cremeopallidum*** H.AH 9391
▩ ***Hebeloma vaccinum* var. *cremeopallidum*** H.AH 9392

Fig. 12 - Gráfica comparativa entre los tamaños esporales (en µm) que presentan *Hebeloma vaccinum* H.AH 10.806 y *H. vaccinum* var. *cremeopallidum* H.AH 9391 y H.AH 9392.

Fig. 12 - Graphic showing the differences between the spore sizes (in µm) of *Hebeloma vaccinum* (H.AH 10.806) and *H. vaccinum* var. *cremeopallidum* (H.AH 9391 and H.AH 9392).

los caulocistidios (-200μm). La única referencia europea sobre este taxon corresponde a Arnolds (1984) en Holanda.

Estos son los únicos datos que, hasta la fecha, hemos podido recopilar sobre esta bella y característica especie del género *Hebeloma*. La creación de *Hebeloma vaccinum* var. *cremeopallidum* se debe fundamentalmente a la constancia en el carácter cromático encontrado en dos recolectas de abundantes carpóforos recogidos en localidades muy alejadas entre sí y en idénticas ecologías. Nunca antes se había recogido *H. vaccinum* presentando un color crema-blanquecino en todos los estudios de crecimiento. Por otra parte, hemos comprobado un carácter en la forma esporal que reviste cierto valor taxonómico y que, según la bibliografía consultada, parece tener la suficiente importancia para apoyar el rango varietal propuesto. Las esporas de *H. vaccinum* var. *cremeopallidum* se han mostrado, en su mayor parte, como largamente amigdaliformes, y tras la medición de más de 40 esporas y ser comparadas con el material típico holandés (Fig. 12), hemos encontrado que el coeficiente longitud/anchura es superior (a veces muy superior) a 2 en el taxon madrileño. El coeficiente encontrado en la var. *vaccinum*, tanto en las mediciones indicadas en la bibliografía como en las realizadas por nosotros con el material de Holanda, parece ser constantemente inferior a 2.

Respecto a sus caracteres ecológicos, ha quedado demostrada la relación micorrizógena del taxon con los géneros *Salix* y *Populus* según los estudios de Hackskaylo & Bruchet (1972) y su presencia constante en ecologías higrófilas (Bruchet, loc. cit. y Delzenne-van Haluwyn, 1971 "marécages, fossés"). Los tamaños de los carpóforos parecen ser variables según se desprende de la bibliografía consultada.

Futuras recolectas intermedias en cuanto a la coloración pileica, tamaño y morfología esporal podrían hacer suponer que nuestro taxon nuevo se tratara de un ejemplo extremo de la variabilidad de la especie (forma), pero hasta el momento, no hemos podido constatar en la bibliografía existente ningún comentario que pudiera reafirmar esta posibilidad, más aún tras el estudio del material holandés.

BIBLIOGRAFIA

ARNOLDS E., 1984 - Standaardlijst van de Nederlandse macrofungi. *Coolia* 26 (suppl.): 1-362.

BOHUS G., 1978 - *Hebeloma* studies, II. (*Basidiomycetes, Cortinariaceae*). *Ann. Hist.-Nat. Mus. Natl. Hung.* 70: 99-104.

BRUCHET G., 1970 - Contribution à l'étude du genre *Hebeloma* (Fr.) Kummer; partie spéciale. *Bull. Soc. Linn. Lyon* 39 (suppl. au n°6): 1-132.

CLÉMENÇON H., 1976 - Neue arten von agaricalen und notizen zu berner Kenswerten funden aus der Schweiz. *Nova Hedwigia* 28: 1-44.

DELZENNE - VAN HALUWYN Ch., 1971 - Notes écologiques sur les champignons supérieurs I. Le genre *Hebeloma. Doc. Mycol. (Lille)* 1: 7-18.

HAYCKSKAYLO E. and BRUCHET G., 1972 - Hebelomas as mycorrhizal fungi. *Bull. Torrey Bot. Club* 99: 17-20.

HESLER L.R., 1977 - New species of *Hebeloma. Kew Bull.* 31: 471-480.

MORENO G., 1980 - Estudios sobre *Basidiomycetes* I. *Agaricales. Anales Jard. Bot. Madrid* 36: 23-42.

ROMAGNESI H., 1965 - Études sur le genre *Hebeloma* I. *Bull. Soc. Mycol. France* 81: 321-344.

SINGER R., 1986 - *The Agaricales in modern Taxonomy*, 4th ed. Koenigstein, Koeltz Scientific Books.

SMITH A.H., EVESON V. and MITCHEL D.H., 1983 - *The veiled species of Hebeloma in the western United States.* Ann Arbor, University of Michigan Press.

VESTERHOLT J., 1986 - Five species of *Hebeloma* not previously recorded from Denmark. *Agarica* 7: 111-119.

Source : MNHN, Paris

ORGANISATION INFRASTRUCTURALE DU MYCELIUM ET DES PROTOPLASTES DE *NECTRIA HAEMATOCOCCA* (BERK. ET BER.) WR. APRES TRAITEMENT PAR LA CYTOHELICASE

J. ORCIVAL et F. LAHBIL

Laboratoire de Cryptogamie, Université Paris-Sud,
91405 Orsay, France.

RÉSUMÉ - Les hyphes de *Nectria haematococca* traités par la cytohélicase en vue de l'obtention de protoplastes présentent, après 3h de traitement, des remaniements importants au niveau du noyau et des organites cytoplasmiques. Les protoplastes obtenus montrent au cours de leur évolution des empilements de vésicules membranaires formées à partir de la membrane nucléaire; ces empilements sont assimilables aux lamelles annelées décrites dans divers matériels tels que les oocytes et certains tissus glandulaires animaux et dans le pollen de quelques plantes. Le rôle de ces structures est discuté.

ABSTRACT - *Nectria haematococca* hyphae, treated by cytohelicase for protoplast obtention, show, after 3h of treatment, important cell modification in the nucleus and in cytoplasmic organelles. The protoplasts show during their evolution, membrane vesicles stacks which may be assimilated to annulate lamellae described in various organisms. The function of these structures is discussed.

MOTS CLÉS : Ascomycètes, infrastructure, lamelles annelées, noyau, protoplastes.

Les protoplastes de champignons filamenteux sont des outils de plus en plus utilisés pour l'étude de nombreux problèmes: formation de la paroi, régénération génétique, transformation. Dans notre laboratoire, nous nous en servons pour l'étude du déterminisme de la différenciation chez *Nectria haematococca* (Daboussi, 1985). Des études préalables sur les divers facteurs influant sur le rendement optimal (Lahbil, 1984) nous ont amenés à effectuer une étude ultrastructurale du mycélium, soumis à l'action de la cytohélicase et des protoplastes à divers stades de leur évolution. Il existe actuellement plusieurs travaux sur l'infrastructure des protoplastes de champignons filamenteux (Gibson & Peberdy, 1972; Isaac & al., 1979; Tanaka &

al., 1981), mais peu d'observations concernent la structure des hyphes traités par les enzymes pectolytiques dans le milieu d'incubation. Manocha (1968) a présenté quelques images de conidies de *Neurospora crassa* traitées de 3 à 4 heures par une solution d'enzyme d'escargot, dans lesquelles on peut observer des modifications de structure du noyau. Nos observations recoupent celles des auteurs précités, et nous permettent d'apporter des précisions sur l'origine et le rôle d'infrastructures cytoplasmiques lamellaires.

MATERIEL ET METHODES

Organisme: *Nectria haematococca* (Berk. et Ber.) Wr., souche sauvage S1, est fourni par le Centraal bureau Voor Schimmerlculture de Baarn (Netherlands).

Culture et obtention de protoplastes: Ces méthodes ont été décrites dans un précédent travail (Lahbil, 1984); nous les rappelons brièvement: du mycélium provenant d'une culture âgée de 20h est préincubé dans une solution de mercaptoéthanol (0,1%) dans KCl 0,6M pH 5,8. Après 4 rinçages dans la solution de KCl 0,6M, le mycélium est resuspendu dans cette même solution contenant la préparation enzymatique (cytohélicase lyophilisée IBF 2 mg/ml, 5 ml de milieu d'incubation pour 0,1g de mycélium). L'incubation dure de 1 à 4 heures.

Techniques de microscopie électronique: Le matériel, traité ou non par la cytohélicase, est fixé pendant 3h dans une solution de glutaraldéhyde à 4% en tampon phosphate 0,1M pH 6,9 additionné de KCl 0,6M. Après 2 rinçages dans le même tampon, le matériel est ensuite post-fixé pendant 18 h dans une solution de tétroxyde d'osmium à 2% et est ensuite pré-inclus dans la fibrine suivant la méthode de Charret & Faure-Fremiet (1967), déshydraté et inclus dans l'Epon. Les coupes fines sont contrastées par l'acétate d'uranyle à 2% pendant 30 mn et par le citrate de Plomb pendant 10 mn.

Pour la détection de polyholosides liés en C1-C4, nous avons utilisé le test Patag d'après Thiery (1967).

RESULTATS

Ultrastructure des hyphes non traités par l'enzyme

Les hyphes âgés de 24h présentent en coupe transversale des caractéristiques suivantes:

- la paroi est d'épaisseur régulière de l'ordre de 90 nm, elle apparaît claire après coloration uranyle-plomb (Fig. 1, 2); le test Patag révèle une structure fibrillaire traduisant la présence de β 1-4 glucanes, essentiellement

de la chitine (Fig. 3); les polyholosides liés en C1-C3 ne sont pas révélés par ce test,

- le cytoplasme a une structure comparable à celle que l'on rencontre généralement chez les ascomycètes; très dense, il contient la plupart des organites habituels: noyau d'aspect homogène, ribosomes, mitochondries (Fig. 2, 3); les amas de glycogène sont abondants (Fig. 1); les vacuoles sont inexistantes. A partir de 24h, les hyphes se remplissent de grosses inclusions lipidiques, qui sont les marqueurs de cellules distales; les organites cellulaires se raréfient, et on peut observer quelques rares vacuoles.

Ultrastructure des hyphes au cours de la digestion enzymatique

On n'observe pas de différence significative entre la structure des hyphes traités durant 1h dans la solution d'enzymes et celle des hyphes non traités. Bien que des protoplastes soient libérés à partir de 30 mn d'incubation (Lahbil, 1984), le nombre d'hyphes sur lequel l'hydrolyse enzymatique produit un effet visible doit être très faible dans les culots fixés.

Par contre, l'observation des culots d'hyphes traités pendant 3h montre:

- des sections d'hyphes dont la paroi n'a pas été (ou peu) attaquée par les enzymes; les structures sont identiques à celles des témoins,

- des structures membranaires diverses, essentiellement des vésicules émises par le plasmalemme au cours de l'extrusion du protoplaste, ou formées secondairement ("subprotoplaste"),

- des sections de protoplastes totalement démunis de parois,

- des sections d'hyphes dont la paroi est plus ou moins digérée (Fig. 4, 5, 6, 7, 8). L'aspect de la paroi de ces hyphes est variable; il peut être identique à celui des hyphes témoins (Fig. 4, flèche) ou moins bien délimité (Fig. 5, 6), pouvant à la limite se présenter comme un résidu fibrillaire diffus (Fig. 8, flèche). Le test Patag révèle une couche externe fortement positive, contenant des granules de 37 nm de diamètre environ, d'épaisseur irrégulière et parfois interrompue par des pores (Fig. 7, flèches). La cytohélicase hydrolysant les glucanes liés en 1-3, cette couche est essentiellement constituée de chitine.

Le cytoplasme montre des différences importantes par rapport à celui des hyphes témoins; il apparaît plus clair, sans doute à cause d'une forte hydratation et contient des vacuoles caractéristiques (Fig. 4, 7, 8). Le glycogène a totalement disparu et ne peut être révélé par le test Patag. Quelques inclusions lipidiques peuvent être observées. Les mitochondries sont parfois dilatées (Fig. 8).

Le noyau présente les modifications les plus remarquables: on peut observer parfois un réarrangement du matériel intranucléaire, qui est plus condensé en périphérie qu'au centre, où il peut apparaître sous forme d'un

réseau fibrillaire lâche; ceci se traduit par une différence d'aspect ténue (Fig. 5, flèches) ou marquée (Fig. 6); on observe également des dilatations localisées ou généralisées de l'enveloppe nucléaire (Fig. 6, 8, têtes de flèches).

Ultrastructure des protoplastes obtenus

Les protoplastes nucléés ont, soit un cytoplasme dont l'organisation est compatible avec une viabilité, soit un cytoplasme fibreux, dépourvu de ribosomes et par conséquent non viable.

La première catégorie est représentée dans les figures 9, 10. Le plasmalemme est plus ou moins ondulé; on peut parfois observer quelques extrusions (Fig. 10, flèche). Les ribosomes sont abondants.

Les mitochondries sont assez nombreuses, avec des crêtes parallèles et une matrix dense (Fig. 9), ou bien avec des crêtes dilatées et une matrix claire (Fig. 10). On observe des inclusions lipidiques denses, et plus rarement de petits amas de glycogène clairs (Fig. 9) dont la nature a pu être vérifiée par le test Patag. Les vacuoles sont généralement présentes et leur taille est variable; elles contiennent parfois des précipités denses constitués de polyphosphates (donnant une coloration métachromatique avec le bleu de toluidine); certaines sections sont dépourvues de vacuoles, le protoplaste n'en contenant pas, ou le plan de coupe ne passant pas à leur niveau.

Nous avons parfois observé des structures assimilables aux appareils de Golgi (Fig. 11), tels qu'ils ont été décrits dans le mycélium de divers champignons filamenteux (Dargent & al., 1982; Newhouse & al., 1983).

Une des caractéristiques les plus remarquables des protoplastes est la présence dans le cytoplasme de cisternes de reticulum lisse; ces cisternes peuvent être aplaties (Fig. 9), dilatées, ou alternativement aplaties et dilatées (Fig. 13, 14, 15); souvent, on peut en observer des empilements importants, jusqu'à une dizaine (Fig. 13); elles peuvent se situer au sein du cytoplasme ou en position périphérique, à proximité du plasmalemme (Fig. 9, flèches, Fig. 11). Ces structures se forment à partir de l'enveloppe nucléaire; celle-ci se dilate localement (Fig. 15, 16, 17), forme des extrusions qui s'isolent dans le cytoplasme sous forme de vésicules qui s'aplatissent latéralement et fusionnent entre elles (Fig. 15, 16).

L'organisation interne du noyau ne présente aucune caractéristique particulière (Fig. 9, 10, 17). Nous n'avons pas retrouvé les ségrégations de matériels vues dans les hyphes en voie de digestion dans la cytohélicase, et décrites dans des protoplastes d'*Aspergillus niger* libérés au bout d'1h (Gibson & Peberdy, 1972). Nous avons parfois observé 2 profils de noyau par coupe provenant de protoplastes plurinucléés.

Le test Patag appliqué aux coupes de protoplastes ne permet pas de détecter l'accumulation de polyholosides liés en C1-C4 à l'intérieur des cisternes; le contraste modéré des membranes est comparable à celui des au-

tres organites; seules quelques petites vésicules contiennent un précipité dense (Fig. 12, flèche).

DISCUSSION

Le passage de cellules hyphales à l'état de protoplastes entraîne des perturbations physiologiques partiellement visualisées par des modifications d'infrastructure. Certaines de ces modifications sont précoces et apparaissent alors que la paroi n'est pas encore totalement désorganisée: il s'agit de l'apparition des vacuoles, du gonflement des mitochondries et de l'enveloppe nucléaire, résultant de l'entrée d'un flux d'eau dans la cellule; la modification de l'organisation nucléaire interne signalée par Manocha (1968) dans des conidies de *Neurospora* en cours de digestion, Gibson & Peberdy (1972) dans des protoplastes d' *Aspergillus* formés précocement et nous-mêmes dans des hyphes de *Nectria* en cours de digestion, ne trouve pas une explication immédiate; s'il ne s'agit pas d'un artefact, on peut y voir une réorganisation "d'urgence" du fonctionnement nucléaire face à des conditions extérieures drastiques, avec modification des priorités au niveau de la transcription; cette hypothèse s'appuie en partie sur le fait que les ribosomes sont abondants dans le cytoplasme des protoplastes, mais nécessiterait une étude plus approfondie à l'aide d'études cytochimiques des acides nucléiques.

La présence de reticulum est générale dans les protoplastes de champignons filamenteux; Gibson & Peberdy (1972) observent du reticulum granuleux dans des protoplastes d' *Aspergillus*; des images de cisternes empilées ont été publiées par Manocha (1968) dans des protoplastes de *Neurospora*, par Isaac & al. (1979) dans des protoplastes d' *Aspergillus*, et par Tanaka & al. (1981) dans des protoplastes de *Pyricularia oryzae*; ces derniers auteurs assimilent ces structures des appareils de Golgi intervenant dans la régénération de la paroi; cette interprétation ne peut être retenue: les appareils de Golgi identifiés chez les Septomycètes ont une morphologie très différente; des études ont été faites à ce sujet par Dargent & al. (1982) chez *Hypomyces chlorinus* et par Newhouse & al. (1983) chez *Endothia parasitica*; dans les protoplastes de *Nectria*, nous avons observé quelques structures pouvant être assimilées aux organites décrits par ces auteurs, et très différentes des empilements lamellaires.

Nous avons vu que, chez *Nectria haematococca*, les empilements de cisternes dans les protoplastes proviennent d'un bourgeonnement de l'enveloppe nucléaire; ce type de structure est comparable aux lamelles annelées décrites dans diverses cellules animales reproductrices ou néoplasiques, et dans des grains de pollen (voir les revues de Wischnitzer (1970) et de Kessel (1983)). Les fonctions attribuées à ces structures sont variées: transport de matériel nucléaire dans le cytoplasme, genèse de reticulum, fixation de polysomes; il n'y a encore aucune évidence pour qu'une ou plusieurs de ces

fonctions puissent être attribuées à ces structures dans les protoplastes de *Nectria*.

Des bourgeonnements de l'enveloppe nucléaire ont été décrits chez divers Ascomycètes, en particulier par Carrol (1967), Wells (1972) et Beckett (1981); les vésicules issues de ces bourgeonnements participent à la formation de la membrane délimitant l'ascospore. Dans les protoplastes de *Nectria*, des cisternes issues de la membrane nucléaire bordent le plasmalemme et peuvent avoir un rôle voisin des bourgeonnements nucléaires des noyaux de l'asque qui participent à la formation du plasmalemme de l'ascospore.

L'organisation de protoplastes naturels, tels que les zoospores de *Pythium* (Groves & Bracker, 1978) et de *Phytophthora* (Bartnicki-Garcia & Hemmes, 1976), nous apporte des informations utiles: dans le cytoplasme de ces cellules, on observe divers types de vésicules périphériques: les unes contiennent des glycoprotéines participant à l'adhésion de la spore, d'autres interviennent dans l'expulsion de l'eau: leur membrane se fusionne avec le plasmalemme et le renouvelle (Pinto da Silva & Nogueira, 1977); des cisternes aplaties bordent la face interne du plasmalemme, sans qu'il y ait évidence d'une fusion éventuelle avec ce dernier; ce type de cellule, provisoirement dépourvu de parois, met en place des structures adaptées à un passage aquatique. Les protoplastes "artificiels", obtenus par digestion des parois des hyphes, réorganisent leur cytoplasme en développant des systèmes membranaires comparables, bien que moins spécialisés; d'autre part, l'hétérogénéité des hyphes (répartition des organites, nature et quantité des réserves nutritives, composition du plasmalemme) explique en partie la variabilité des structures observées dans les protoplastes de *Nectria* et le fait qu'une partie seulement d'entre eux peut régénérer. Cette réorganisation cytoplasmique, caractérisée par une synthèse importante de membranes, mobilise les réserves préexistantes dans les hyphes, glycogène et lipides, et s'accompagne d'une activité mitochondriale importante.

En conclusion, nous proposons un schéma interprétatif de la transformation de la cellule hyphale en protoplaste chez *Nectria haematococca* (Fig. 18).

BIBLIOGRAPHIE

BARTNICKI-GARCIA S. and HEMMES D.E., 1976 - Some aspects of the form and function of oomycetes spores. *In*: W.M. HESS & D.J.WEBER, *The fungal spore. Form and Function.* New-York, John Wiley and Sons: 593-641.

BECKETT A., 1981 - Ascospores formation. *In:* G.TURIAN & H.R. HOHL, *The fungal spore: Morphogenetic controls.* Academic Press, London, New-York, San Francisco: 108-129.

CARROL G.C., 1967 - The ultrastructure of ascospore delimitation in *Saccobolus kerverni. J. Cell Biol.* 33: 218-224.

CHARRET R. et FAURE-FREMIET E., 1967 - Technique de rassemblement de microorganismes. Préinclusion dans un caillot de fibrine. *J. Microscop.* 6: 1063-1066.

DABOUSSI M.J., 1985 - Loss of a cytoplasmic factor through ethidium bromide and elevated temperature treatments in *Nectria haematococca. Canad. J. Bot.* 31: 104-108.

DARGENT R., TOUZET-SOULET J.M., RAMI J. and MONTANT C., 1982 - Cytochemical caracterization of Golgi apparatus in some filamentous fungi. *Exp. Mycol.* 6: 101-114.

GIBSON R.K. and PEBERDY J.F., 1972 - Fine structure of protoplasts of *Aspergillus nidulans. J. Gen. Microbiol.* 72: 529-538.

GROVES N. and BRACKER C.E., 1978 - Protoplasmic changes during zoospore encystement and germination in *Pythium aphanidermatum. Exp. Mycol.* 2: 51-97.

ISAAC S., BRIARTY L.G. and PEBERDY J.F., 1979 - The stereology of protoplasts from *Aspergillus nidulans. In*: L. FERENCZY & G.L. FARKAS, *Advances in Protoplasts Research.* Budapest, Akadémiai Kiado, Oxford, Pergamon Press: 213-219.

KESSEL R.G., 1983 - The structure and function of annulate lamellae: Porous cytoplasmic and intranuclear membranes. *Int. Rev. Cytol.* 82: 181-303.

LAHBIL F., 1984 - Les protoplastes de *Nectria haematococca* (Berk. et Br.) Wr.: obtention, régénération de mycélium et fusion. Thèse de 3ème Cycle, Paris-Sud, Orsay.

MANOCHA M.S., 1968 - Electron microscopy of the conidial protoplast of *Neurospora crassa. Canad. J. Bot.* 46: 1561-1564.

NEWHOUSE J.R., HOCH H.C. and MACDONALD W.L., 1983 - The ultrastructure of *Endothia parasitica* comparison of ■ virulent with ■ hypovirulent isolate. *Canad. J. Bot.* 61: 389-399.

PINTO DA SILVA P. and NOGUEIRA M.L., 1977 - Membrane fusion during of *Phytophthora palmivora* zoospores during encystment. *J. Cell Biol.* 78: 161-181.

TANAKA H., OGASAWARA N. and KAMINIYA S., 1981 - Protoplasts of *Pyricularia oryzae* P2: Preparation and regeneration into hyphal form. *Agric. Biol. Chem.* 45: 1541-1552.

THIERY J.P., 1967 - Mise en évidence de polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Microscop.* 6: 987-1018.

WELLS K., 1972 - Light and electron microscopic studies of *Ascobolus stercoriarius.* II. Ascus and Ascorpore Ontogeny. *Univ. Calif. Publ. Bot.* 62: 1-33.

WISCHNITZER S., 1970 - The annulate lamellae. *Int. Rev. Cytol.* 27: 65-100.

EXPLICATION DES FIGURES

Echelle: 0,5μm.

Figure 1: Coupes d'hyphes d'une culture de 24h. Les sections les plus jeunes sont riches en glycogène. Les sections plus âgées (à droite) contiennent des inclusions lipidiques (en noir). g = glycogène, l = inclusion lipidique.

Figure 2: Section transversale d'hyphe. Le noyau (N) a une structure homogène, la paroi est peu contrastée.

Figure 3: Coupe d'hyphe témoin traité par le test Patag; le glycogène est contrasté en noir, la structure fibrillaire de la paroi est mise en évidence. (N = noyau, m = mitochondrie).

Figure 4: Vue d'ensemble d'hyphes traités par la cytohélicase pendant 3h. Le glycogène a disparu; on observe des vacuoles (V). L'aspect des parois est variable. La flèche indique une paroi comparable à celle de la Fig. 2.

Figure 5: Coupe d'hyphe traité par la cytohélicase; la paroi apparaît légèrement digérée (tête de flèche): on observe une légère ségrégation du matériel nucléaire (flèches).

Figure 6: Même traitement: la digestion de la paroi est plus avancée; l'envelop-pe nucléaire est dilatée, et on observe une ségrégation spectaculaire entre un matériel nucléaire fibreux central et un matériel granulaire périphérique.

Figure 7: Test Patag: il ne reste de la paroi qu'une couche granulaire fortement positive et percée par endroits (flèches).

Figure 8: Coupe traitée par la cytohélicase; l'enveloppe nucléaire est dilatée par endroits; le cytoplasme contient des vacuoles (V) (m = mitochondries).

Figure 9: Vue générale d'un protoplaste de *Nectria haematococca*: on observe un noyau (N), une vacuole remplie de matériel dense (V), des mitochondries à matrix dense et crêtes développées (m), des cisternes de reticulum dont certaines bordent le plasmalemme (flèches).

Figure 10: Autre type de protoplastes; les mitochondries ont une matrix claire et des crêtes peu développées (flèche); le plasmalemme est sinueux avec quelques extrusions (flèche).

Figure 11: Empilement de cisternes de reticulum lisse; l'organite indiqué par des flèches est peut-être un appareil de Golgi.

Figure 12: Cisternes dilatées contre la face interne du plasmalemme; la coupe a été traitée par la méthode Patag; seule une vésicule présente une légère réaction positive (flèche).

Figure 13: Empilements de cisternes dans le cytoplasme; ce type de structure est assimilable aux lamelles annelées.

Figure 14: Autre aspect des empilements; les cisternes sont périodiquement dilatées et aplaties à droite, agglomérat de débris membranaires.

Figure 15: Formation des cisternes; la membrane nucléaire externe présente une série de dilations (flèches) dont l'aspect est comparable aux cisternes dilatées du cytoplasme.

Figure 16: Détail de 2 bourgeonnements de la membrane nucléaire externe.

Figure 17: L'enveloppe nucléaire montre des régions aplaties, d'autres dilatées (flèches), précédent la formation d'une nouvelle travée de cisternes. (nu = nucléole; v = vacuole).

Figure 18: Représentation schématique de la transformation d'un hyphe en protoplaste chez *Nectria haematococca:* L'hyphe (1) perd sa paroi (2) et le protoplaste se réorganise (3,4).

EXPLANTATION OF THE PLATES

Scales: 0,5μm.

Figure 1: Hyphae section from a 24h culture. Youngest hyphae are rich in glycogen. Older hyphae (on the right) countain lipid inclusions (in black) g = glycogen, L = lipid inclusions.

Figure 2: Hyphae transversal section. Nucleus (N) has an homogeneous structure, wall is not very contrasted.

Figure 3: Hyphae section after Patag test; glycogen is black, fibrillar structure of the wall appears. (N = nucleus, m = mitochondria).

Figure 4: Global view of 3h cytohelicase treated hyphae. Glycogen has desappeared. Some vacuoles are observed (V). Walls appearance varies. Arrow shows a wall comparable with the on of Fig.2.

Figure 5: Cytohelicase treated hyphae: Wall is slightly digested (arrow head); a slight segregation in nuclear material may be observed (arrows).

Figure 6: Same treatment. Wall digestion is more advanced. Nuclear cover is dilated, and dramatic segregation is seen between a fibrous central nuclear material and a granular peripheric material.

Figure 7: Patag test: a strongly positive granular layer, with holes (arrows) is the rest of the wall.

Figure 8: Cytohelicase treatment: nuclear cover is dilated in places; the cytoplasm countains vacuoles (V). (m = mitochondrion).

Figure 9: General view of a protoplast of *Nectria haematococca*: it is observed a nucleus (N), a vacuole with dense material (V), mitochondria with dense matrix and developed cristae (m), reticulum cisternae of which some are along the plasmalemme (arrows).

Figure 10: Other type of protoplast; mitochondria have clear matrix and little cristae (arrow); plasmalemme is sinuous with some extrusions (arrow).

Figure 11: Stacks of smooth reticulum vesicules; structure pointed out by arrow is perhaps a Golgi apparatus.

Figure 12: Dilated vesicles along plasmalemme inner face; the section is treated by Patag method; a single vesicle (arrow) shows a slight positive reaction.

Figure 13: Cisternae stacks in the cytoplasm; this structure may be assimilated to annulate lamellae.

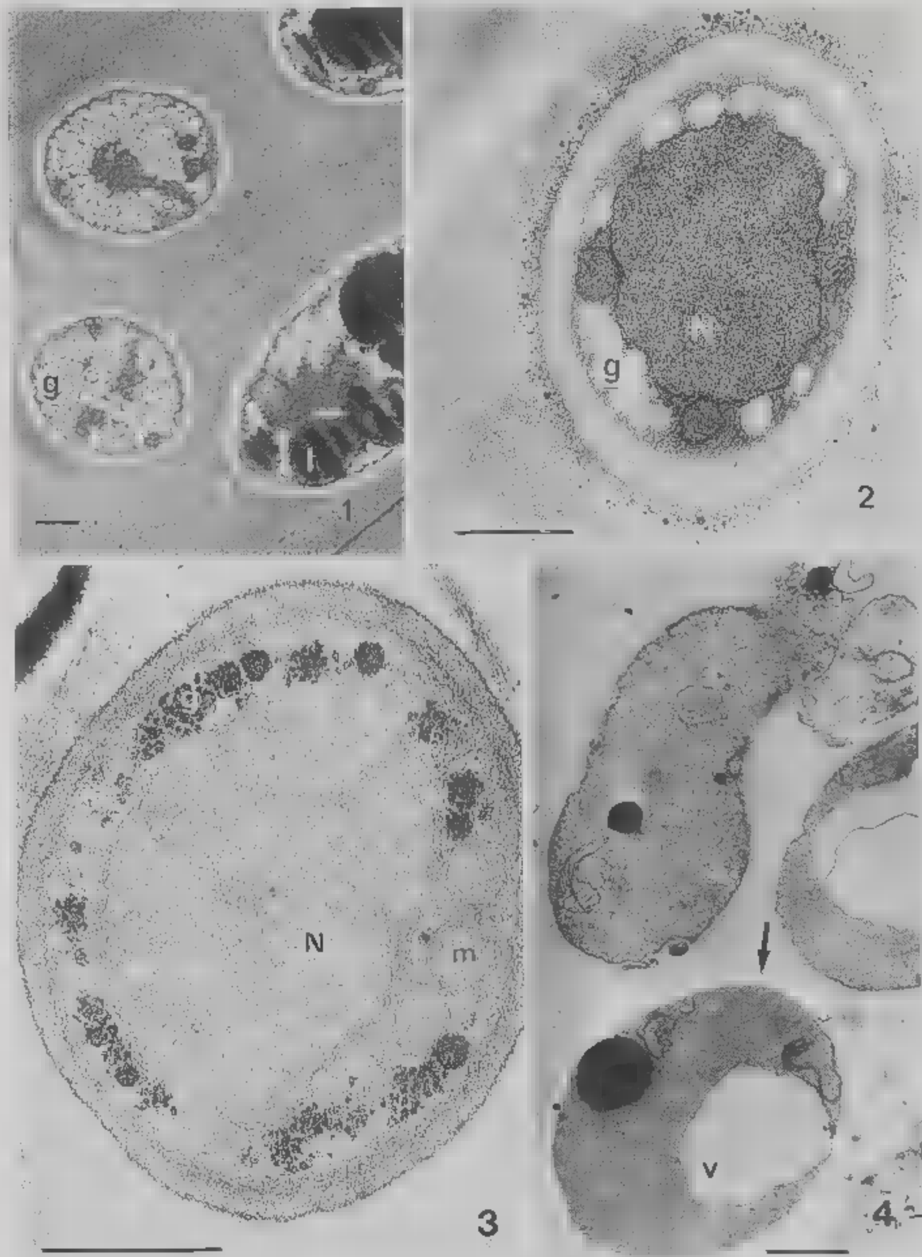
Figure 14: Other appearance of stacks; the cisternae are periodically dilated and flattened; on the right, agglomerate of membrane fragments.

Figure 15: Cisternae formation; outer nuclear membrane shows serial dilatations (arrows) whose appearance is comparable to dilated cisternae in the cytoplasm.

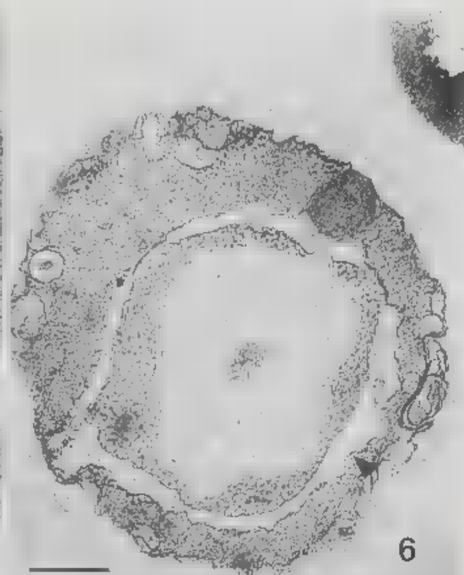
Figure 16: Detail of two blebs of outer nuclear membrane.

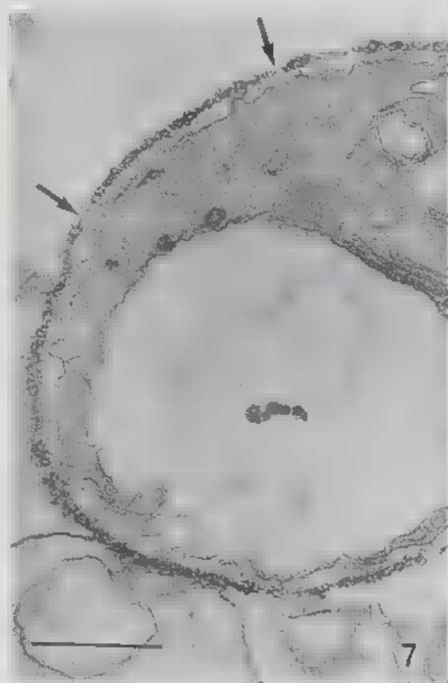
Figure 17: Nuclear cover shows flattened zones, other are dilated, before the formation of a new row of cisternae.

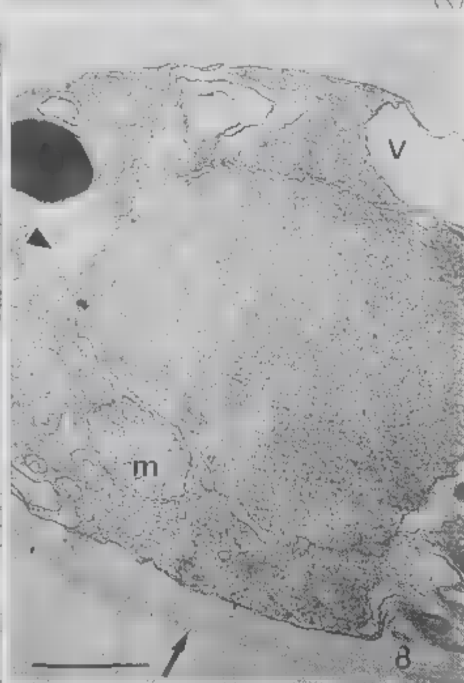
Figure 18: Schematic representation of hyphae into protoplast transformation in *Nectria haematococca:* The hyphae (1) loss his wall (2) and the protoplast is reorganized (3, 4).

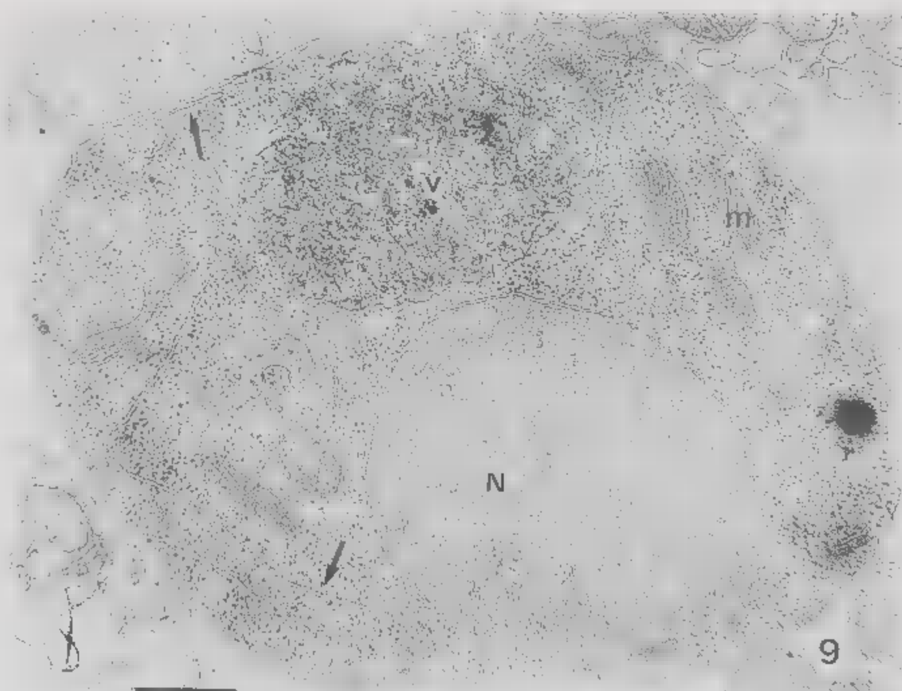

g
t
1
g
2
N
m
3
v
4


5

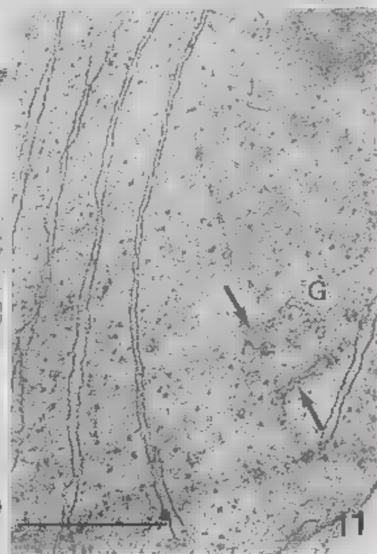

6

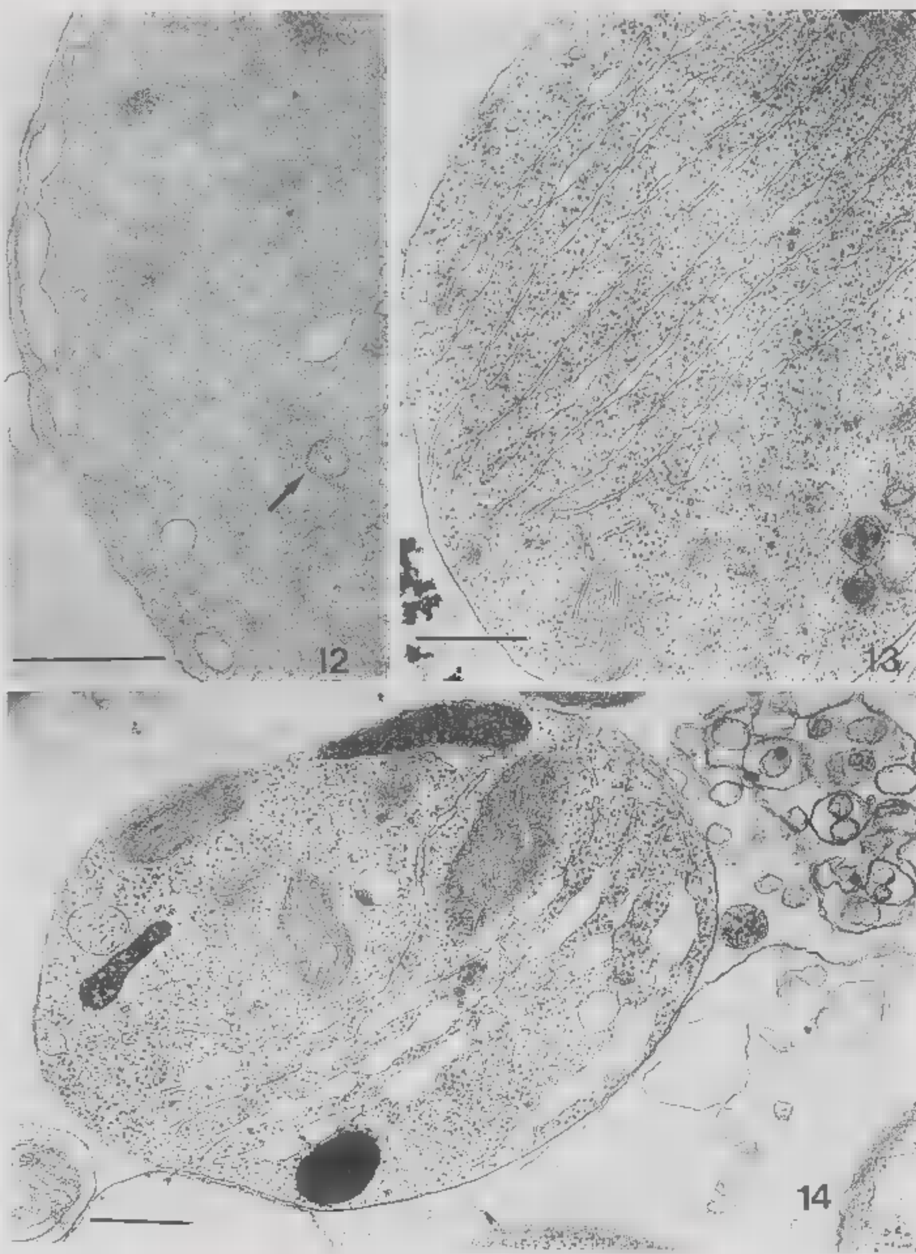

7


V
m
8


V
m
N
9


10


G
11


12
13
14

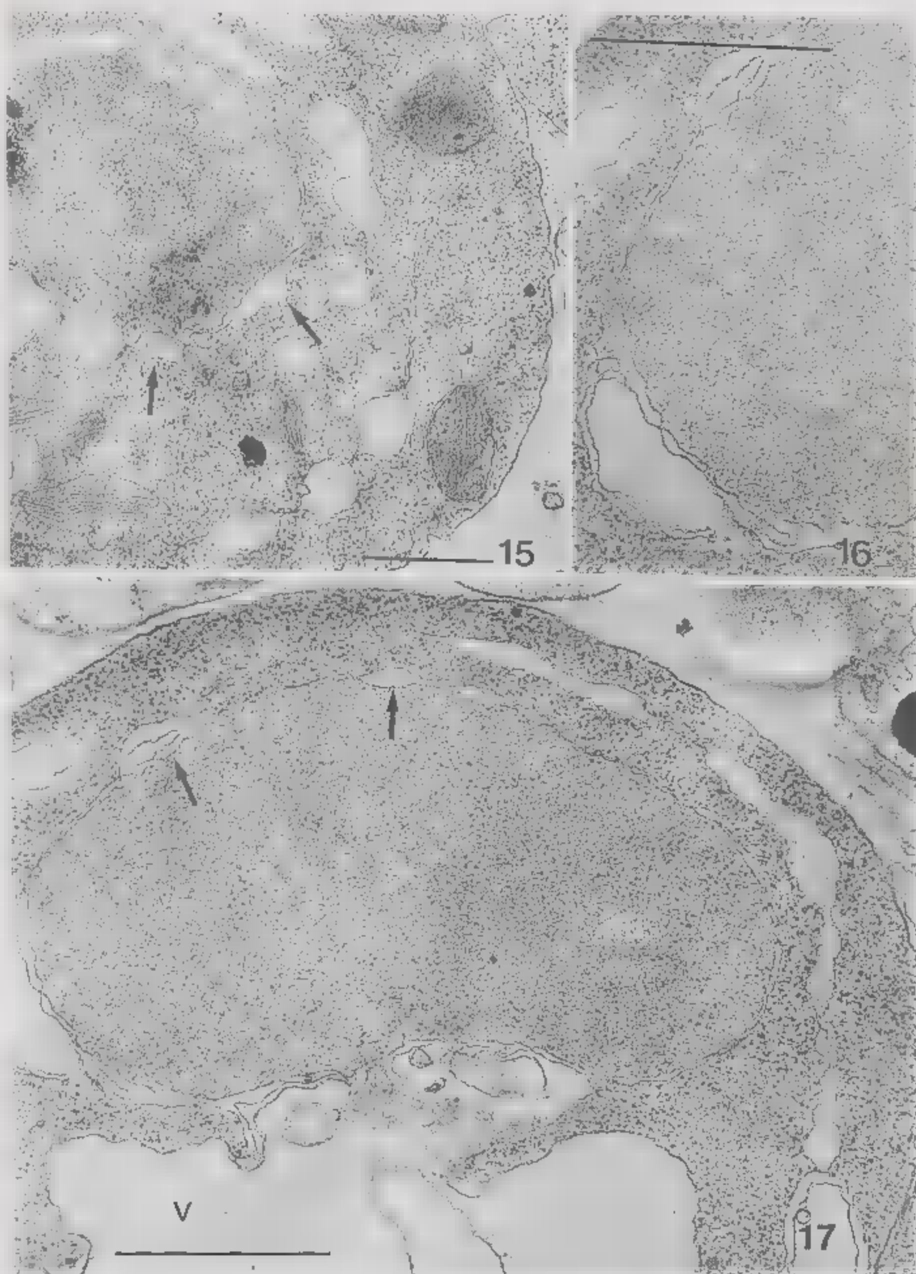
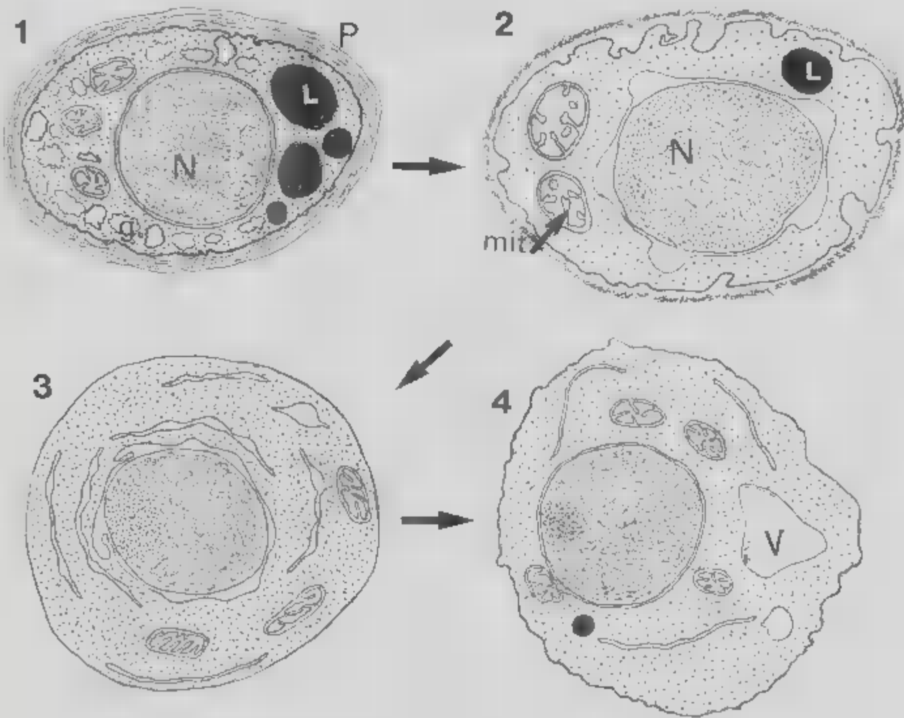

15
16
V
17

Figure 18



Cryptogamie, Mycol., 1990, 11 (1): 47-68

L'APPAREIL SPOROPHYTIQUE ET LES ASQUES DU *TUBER MELANOSPORUM* VITT.
(Truffe noire du Périgord, Discomycètes)

A. PARGUEY-LEDUC*, M.C. JANEX-FAVRE*, C. MONTANT**

* Laboratoire de Cryptogamie, Université Pierre et Marie Curie, 7, Quai Saint-Bernard - 75252 Paris Cedex 05 - France

** Laboratoire de Cryptogamie, Université Paul Sabatier, 118, Route de Narbonne - 31602 Toulouse Cedex - France

RÉSUMÉ - L'appareil sporophytique du *Tuber melanosporum* comprend successivement une phase prosporophytique (vésicule plurinucléée) et une phase ascosporophytique (hyphes dicaryotiques terminées par des dangeardies ascogènes). Les asques présentent des particularités remarquables : forme globuleuse, polarité dans la répartition des constituants, relative simplicité de la paroi, délimitation individuelle des ascospores, réduction de leur nombre et présence d'un sac postsporal. Ces caractères, également trouvés chez d'autres espèces du genre *Tuber* et dans le genre voisin *Terfezia*, justifient, au moins pour ces deux genres hypogés très proches, la distinction d'un ordre des Tubérales au sein des Discomycètes.

ABSTRACT - In *Tuber melanosporum* sporophytic apparatus comprises two successive stages: 1. prosporophytic multinucleate vesicles and 2. ascosporophytic dicaryotic hyphae with ascogenous croziers at the tip. Asci show strong peculiarities : globular shape, polarity in the components distribution, non-complexity of ascus wall, process of individual ascospore delimitation, occurrence of a postsporal membrane surrounding the ascospores which are less than eight in number. *Tuber melanosporum* shares those features with other species in the genus *Tuber* as with *Terfezia* species, which justifies, for both hypogeous genera at least, the distinction of order Tuberales within Discomycetes.

MOTS CLÉS : appareil sporophytique, asque, ultrastructure, Tubérales, *Tuber*.

Dans le cadre de l'étude approfondie de l'ascocarpe de *Tuber melanosporum* Vitt. que nous avons entreprise (Montant et al., 1983; Kulifaj, 1984; Parguey-Leduc et al., 1984, 1985, 1987a et b, 1988, 1989) nous décrivons dans cet article nos observations en microscopie photonique et

électronique sur l'appareil sporophytique et les asques qui en dérivent; par contre, nous ne reprendrons pas l'étude de l'ascosporogénèse et de l'évolution des ascospores que nous avons déjà rapportée antérieurement.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les échantillons étudiés, récoltés à divers stades pour que l'évolution ontogénique puisse être suivie, proviennent de France (Visan et Valréas - Vaucluse -; Les Eyzies - Dordogne -).

Pour les études en microscopie photonique, des préparations par écrasement ont été effectuées dans l'eau ou divers colorants : le rouge neutre, le bleu BZL, le bleu coton, l'encre stylographique, le lugol et le vert Visba. Des colorations sur coupes (après fixation par le liquide de Westbrook et inclusion dans la paraffine) ont en outre été réalisées à l'aide de l'hématoxyline ferrique.

Pour les études en microscopie électronique par transmission, des fragments des ascocarpes ont été traités par les méthodes classiques : double fixation par le glutaraldéhyde à 6% et le tétroxyde d'osmium à 2%, avec tampon de Sörensen, inclusion dans la résine de Spurr. Les coupes, effectuées à l'aide d'un ultramicrotome Reichert OMU 3, ont été contrastées par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb (18 minutes) ou traitées par la technique de Thiéry (1967), et observées à l'aide d'un microscope Philips 30.15 sous une tension d'accélération de 80 KV. Des coupes semi-fines, colorées par la pyronine, ont été observées au microscope photonique.

I - APPAREIL SPOROPHYTIQUE ET FORMATION DES ASQUES

Les éléments sporophytiques se distinguent aisément, en microscopie photonique, sur les coupes colorées par l'hématoxyline du fait de leur grande affinité pour ce colorant, et ce aux divers stades du développement de l'ascocarpe (Parguey-Leduc et al., 1984, 1985, 1987b).

Au stade apothécioïde (Parguey-Leduc et al., 1985 et Fig. 1), l'appareil sporophytique se présente sous forme de filaments disposés en cupule. Ultérieurement, alors que l'ascocarpe est devenu globuleux (Parguey-Leduc et al., 1984 et Fig. 2), ces filaments sont disposés dans la glèbe au sein de veines fertiles, enserrées dans les circonvolutions de veines stériles aérifères. Localisés en premier lieu dans la partie axiale des veines fertiles (*vf*, 1, Fig. 3), ils se développent ensuite en direction centrifuge (2) et atteignent ainsi la base de la palissade de paraphyses qui borde les veines stériles (*vs*). Plus tard, ils progressent vers la périphérie de l'ascocarpe jusqu'à la base des écailles (*e*) du péridium (3, puis 4), dans lesquelles ils peuvent même exceptionnellement pénétrer (Parguey-Leduc et al., 1987b).

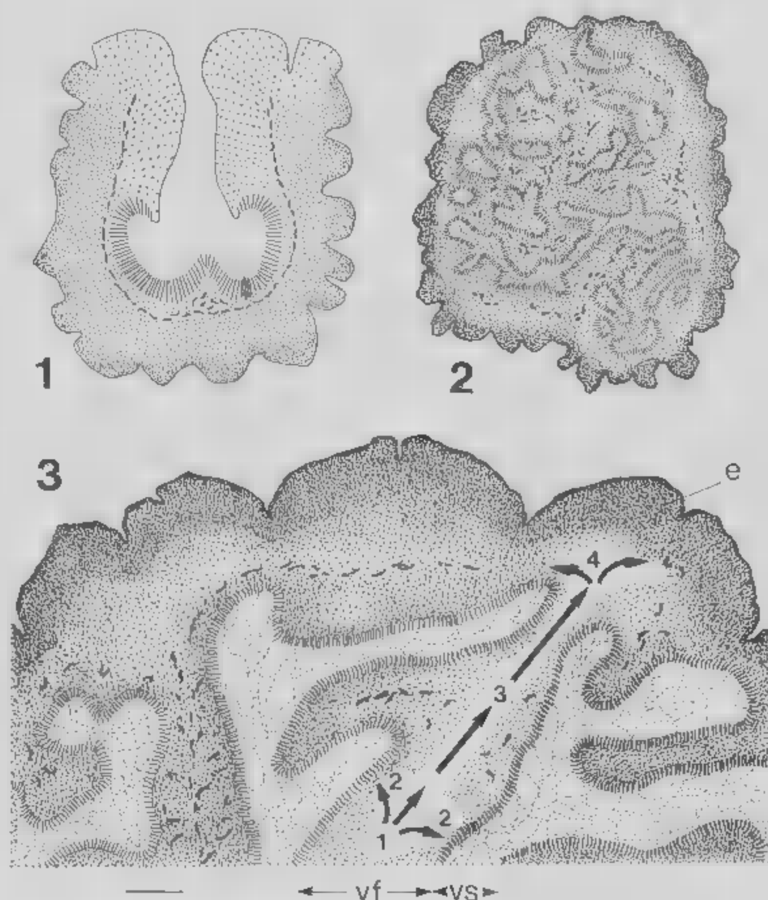


Fig. 1 à 3 : structure de l'ascocarpe (microscopie photonique). Fig. 1 : jeune ascocarpe au stade apothécioïde; Fig. 2: jeune ascocarpe devenu globuleux; Fig. 3: détail de la périphérie d'un ascocarpe montrant la progression de l'appareil sporophytique, puis des asques, de la partie axiale d'une veine fertile vers la base d'une écaille du péridium (de 1 à 4). *e*: écaille; *vf*: veine fertile; *vs*: veine stérile. Echelle: Fig. 1, 12,5µm; Fig. 2, 500µm; Fig. 3, 100µm.

Fig. 1 to 3: ascocarp structure (light microscope). Fig. 1 : young ascocarp, apothecioid stage; Fig. 2 : young globular ascocarp; Fig. 3 : detail of the peripheral part of an ascocarp showing sporophytic apparatus and asci moving from the axial part of a fertile vein to the base of a peridial scale. *e*: scale; *vf*: fertile vein; *vs*: sterile vein. Scale: Fig. 1, 12,5µm; Fig. 2, 500µm; Fig. 3, 100µm.

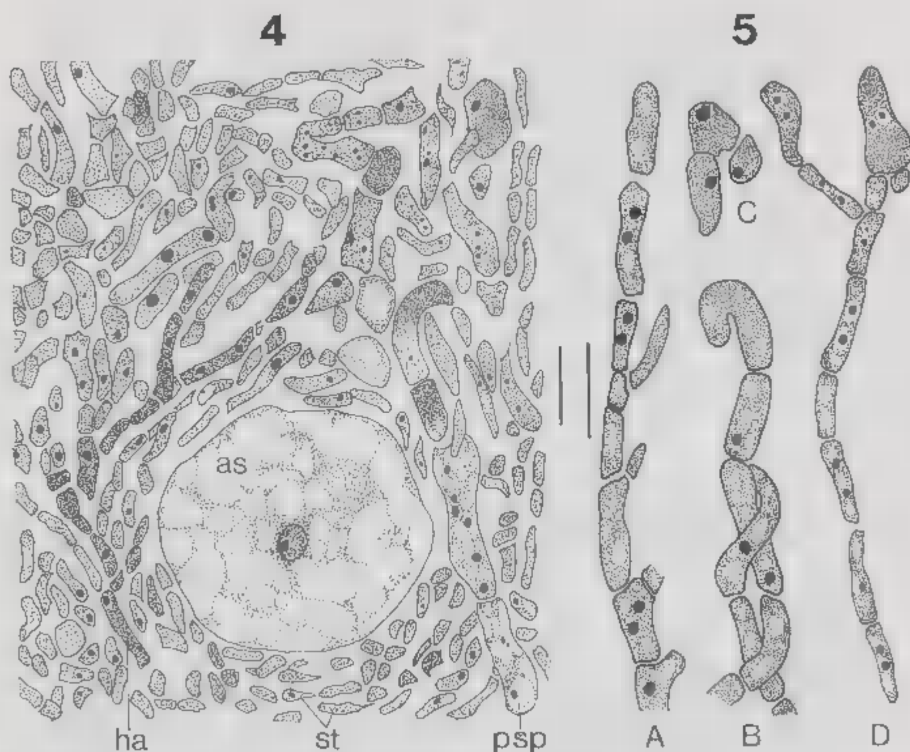


Fig. 4 et 5 : appareil sporophytique (microscopie photonique). Fig. 4: portion d'une veine fertile comportant, outre les éléments stériles (*st*), des éléments fertiles: vésicule prosporophytique (*psp*), hyphes ascogènes (*ha*) et asques (*as*). Fig. 5, A à D: détail d'hyphes ascogènes. Echelle : 10μm.

Fig. 4 and 5 : sporophytic apparatus (light microscope). Fig. 4: part of a fertile vein comprising sterile (*st*) and fertile elements: prosporophytic vesicle (*psp*), ascogenous hyphae (*ha*) and asci (*as*). Fig. 5, A to D: detail of ascogenous hyphae. Scale: 10μm.

Enfin, au stade adulte apparaissent les premiers asques; l'ascocarpe atteint alors un poids de quelques milligrammes. Ils deviennent ensuite sporogènes et de plus en plus abondants, ce qui entraîne un important développement des veines fertiles, tandis que les veines stériles sont écrasées et s'amenuisent.

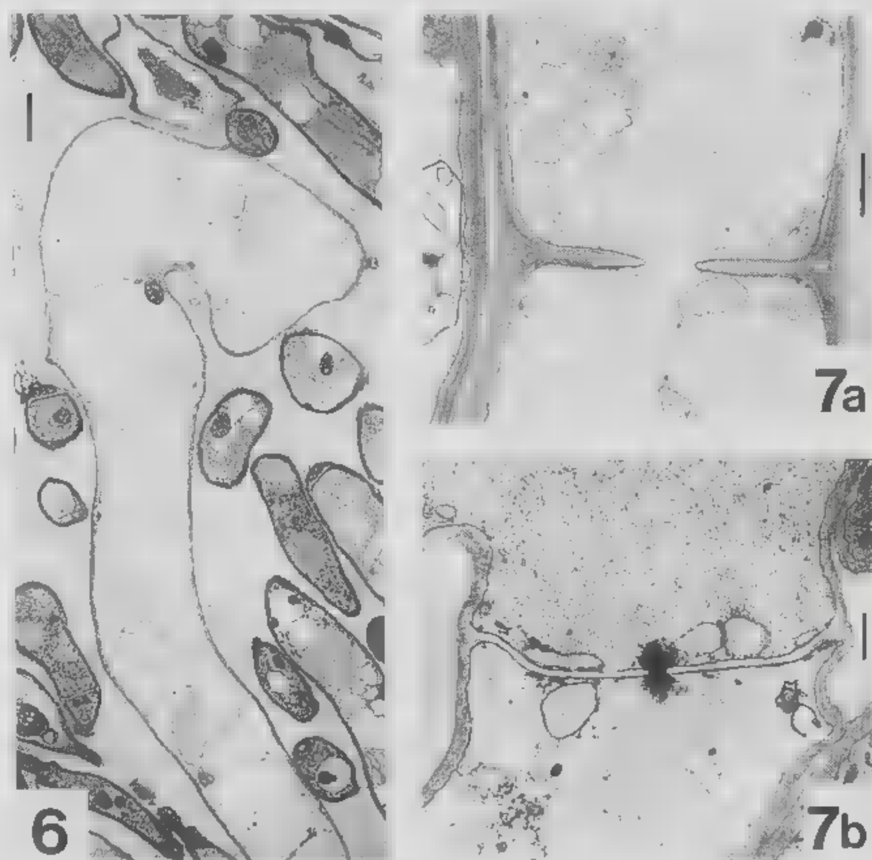


Fig. 6 et 7 : appareil prosporophytique (microscopie électronique). Fig. 6 (technique de Thiéry): vésicule prosporophytique environnée de filaments stériles; Fig. 7, a et b: détail des septums. Echelle: Fig. 6, 2μm; Fig. 7, 0,5μm.

Fig. 6 and 7 : prosporophytic apparatus (electron microscope). Fig. 6 (Thiéry's technique): prosporophytic vesicle surrounded by sterile filaments; Fig. 7, a and b: detail of septa. Scale: Fig. 6, 2μm; Fig. 7, 0,5μm.

1 - Appareil sporophytique

Les veines fertiles sont composées d'éléments stériles (*st*, Fig. 4) étroits, à cellules en principe uninucléées, et d'éléments fertiles correspondant aux stades successifs de l'évolution de l'appareil sporophytique, telle que l'a décrite Chadefaud (1944, 1952, 1953a et b, 1960). Selon cet auteur, rappelons-le, l'ascogone, en principe après fécondation, évolue en un appa-

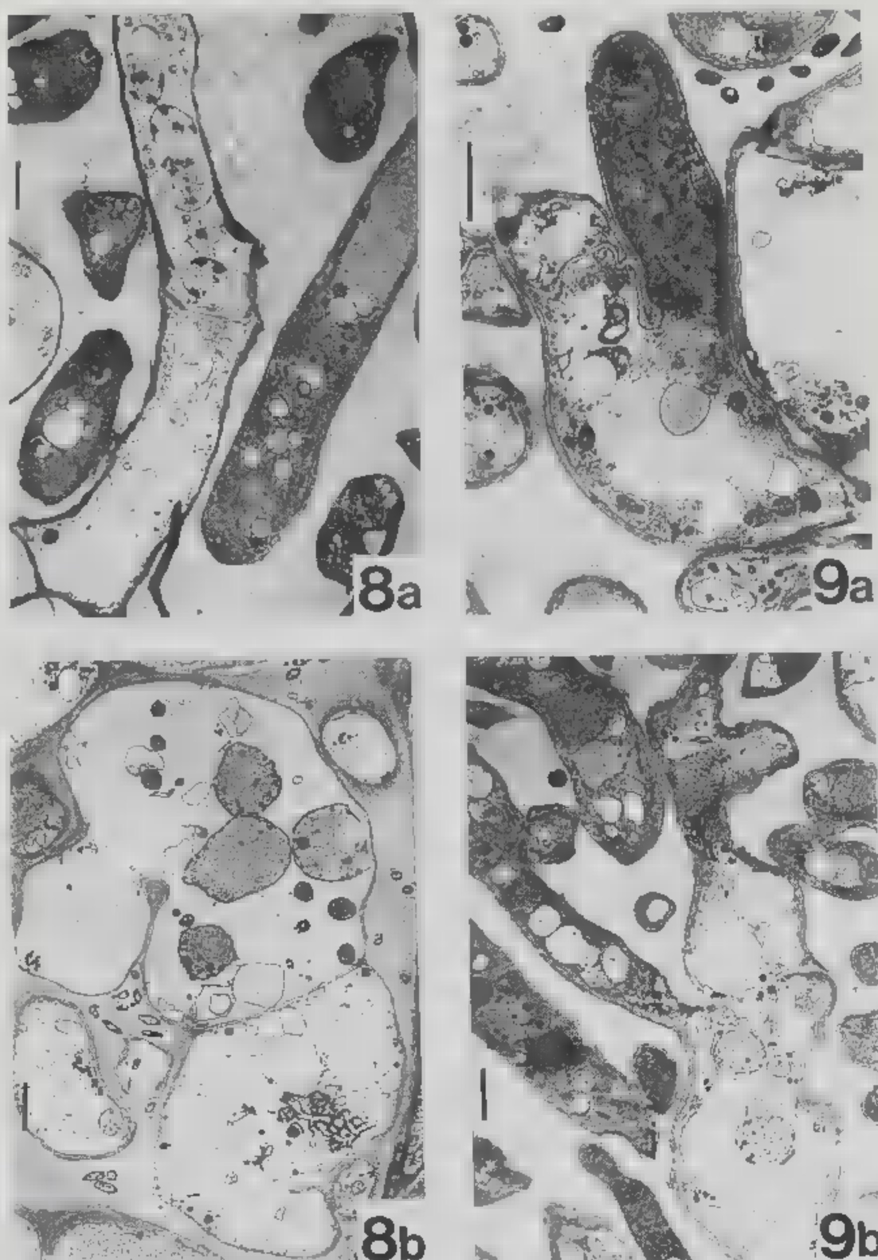


Fig. 8 et 9 : appareil prosporophytique (microscopie électronique). Fig. 8, a et b: vésicules plurinucléées; Fig. 9, a et b: bourgeonnement des hyphes ascogènes. Echelle: 2µm.

Fig. 8 and 9 : prosporophytic apparatus (electron microscope). Fig. 8, a and b: multinucleate vesicles: Fig. 9, a and b: budding of ascogenous hyphae. Scale: 2µm.

reil sporophytique, formé d'abord d'un prosporophyte puis d'un ascosporophyte bourgeonné par celui-ci.

Chez le *T. melanosporum*, l'ascogone n'a pas été identifié du fait que les tout premiers stades de formation de l'ascocarpe n'ont pu être repérés sur le terrain, en raison de leur petitesse. Rappelons toutefois que Chaze (1950) a obtenu en culture des vésicules qu'il considère comme des oogones du *T. melanosporum* et que Marchisio (1964) a décrit, chez le *Tuber maculatum*, des oogones et des anthéridies, différenciés à l'extrémité d'"hyphes ascogènes"; d'après ce dernier auteur, les oogones, après fécondation, se transforment directement en asques; ce processus est en désaccord avec les vues de Chadefaud et nos propres observations. Celles-ci débutent au stade du prosporophyte (*psp*, Fig. 4), composé de volumineuses vésicules boursouflées irrégulièrement, vacuolisées et plurinucléées. En microscopie électronique (Fig. 6, 8 a et b), elles apparaissent tantôt sub-cylindriques, tantôt bosselées ou même pourvues de protubérances marquées. Leurs cloisons transversales présentent un pore médian, qui peut être simple (Fig. 7a) ou obturé par une formation opaque aux électrons, en forme de sablier (Fig. 7b).

Le bourgeonnement de l'ascosporophyte à partir de vésicules prosporophytiques a été observé en microscopie électronique (Fig. 9 a et b); il en résulte des éléments de diamètre moindre et à contenu plus dense aux électrons, avec deux volumineux noyaux associés que l'on peut probablement considérer comme un dicaryon (Fig. 9a). Ceux-ci évoluent ensuite en hyphes ascogènes, bien visibles en microscopie photonique du fait de leur forte colorabilité (*ha*, Fig. 4); plusieurs fois ramifiées elles sont composées de cellules généralement binucléées (Fig. 5).

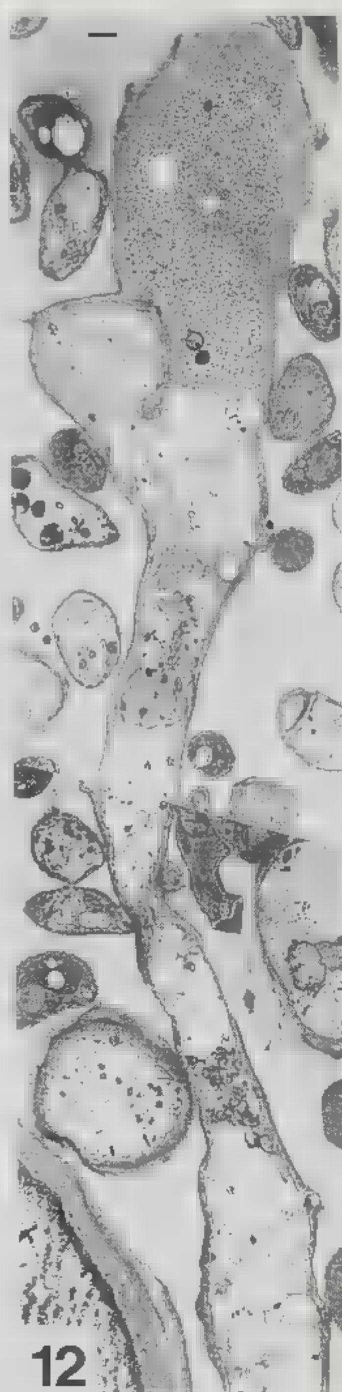
Les filaments de l'appareil sporophytique avaient déjà été observés par Greis (1938) chez le *Tuber aestivum* et le *T. brumale*, mais nous n'avons pas retrouvé les crochets accompagnant la formation de chacune des cloisons transversales que décrit cet auteur; il s'agirait peut-être, en réalité, comme chez le *T. melanosporum*, de jeunes ramifications latérales (Fig. 5A). Par contre, nous avons retrouvé le crochet terminal figuré par Greis (Fig. 5B): il est à l'origine d'une cellule proascale (Fig. 5C) et termine une hyphe ascogène à cellules binucléées (Fig. 5D).

2 - Formation des asques

Dans le crochet qui termine une hyphe ascogène, deux cloisons transversales se forment, l'une à la base et l'autre près du sommet, délimitant, selon le processus décrit par Dangeard (1894), une cellule proascale binucléée et un bec latéral (Fig. 5C, 10). Ce dernier se soude ensuite au pied; leur cloison mitoyenne disparaissant, il s'ensuit la formation d'une cellule sousascale dans laquelle sont associés le noyau de la cellule-pied et celui du bec (Fig. 11). Corrélativement, la cellule proascale, terminant une hyphe


10


11


12

ascogène à cellules binucléées (Fig. 5D, 12), s'allonge; son contenu est plus dense aux électrons (Fig. 13) que celui de la cellule sous-ascale, abondamment vacuolisé. Après fusion de ses deux noyaux en un volumineux noyau unique, disposé au centre de la cellule (Fig. 14), elle devient un asque, de forme encore allongée; dans tout son volume sont disséminées de petites vacuoles autour desquelles se répartissent des grains de glycogène fortement réactifs au test de Thiéry.

II - EVOLUTION ET STRUCTURE DES ASQUES
(microscopie photonique)

Elles ont été suivies sur préparations par écrasement et sur coupes. Le jeune asque représenté par la figure 15A est encore rattaché à l'hyphe ascogène; à sa base est bien visible le bec latéral, vestige du crochet dangeardien (Chadefaud, 1944).

Au stade suivant, l'asque est devenu plus gros et sub-globuleux (Fig.15B). Les vacuoles sont particulièrement bien individualisées, réparties dans tout le volume ascal, autour du noyau central. Par la suite, l'asque continue à grossir; sa paroi s'épaissit et ses constituants tendent à se répartir en zones distinctes (Fig. 15C); une telle zonation est caractéristique du genre *Tuber* (Parguey-Leduc & Janex-Favre, 1977, 1981) et même d'autres Tubérales (Janex-Favre et al., 1988). La partie inférieure de l'asque, correspondant à plus des 2/3 de son volume, est remarquablement riche en glycogène; au-dessus se localisent la majorité des vacuoles, souvent pourvues chacune d'un précipité pyroninophile visible sur les coupes semi-fines puis, tout à fait au sommet, un cytoplasme finement granuleux entourant le noyau. Par la suite, ce dernier se divise et les noyaux-fils deviennent les noyaux sporaux : les jeunes ascospores sont ainsi différenciées au sommet de l'asque (Fig. 15D).

Ultérieurement, le groupe d'ascospores en voie de maturation se localise au centre de l'asque (Fig. 15E); il est alors contenu à l'intérieur du sac postsporal antérieurement décrit chez diverses Truffes (Chadefaud, 1976; Parguey-Leduc & Janex-Favre, 1977, 1981); d'épaisseur irrégulière, ce sac est nettement souligné par les divers colorants utilisés. A l'extérieur du sac, le

---

Fig. 10-12 : formation des asques (microscopie électronique). Fig. 10: crochet dangeardien; Fig. 11: cellule proascale et sa base dangeardienne; Fig. 12: cellule proascale à l'extrémité d'une hyphe ascogène. Echelle: 1μm.

Fig. 10-12: ascus formation (electron microscope). Fig. 10: crozier; Fig. 11: proascal cell with basal crozier; Fig. 12: proascal cell at the tip of an ascogenous hypha. Scale: 1μm.

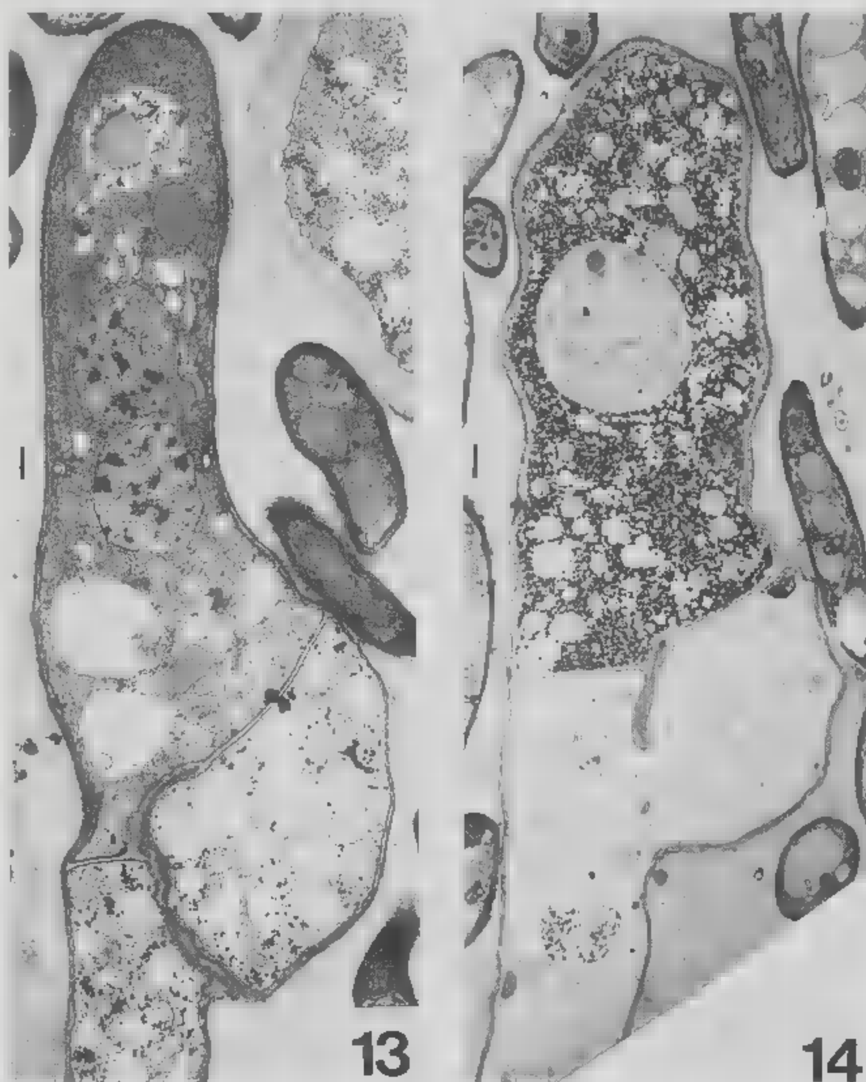


Fig. 13 et 14 : transformation de la cellule proascale en asque (microscopie électronique, technique de Thiéry). Fig. 13: cellule proascale binucléée; Fig. 14: jeune asque uninucléé; les bases dangeardiennes sont bien visibles. Echelle: 1 μm.

Fig. 13 and 14 : evolution from a proascal cell into an ascus (electron microscope, Thiéry's technique). Fig. 13: binucleate proascal cell; Fig. 14: young uninucleate ascus. Note the basal croziers. Scale: 1 μm.

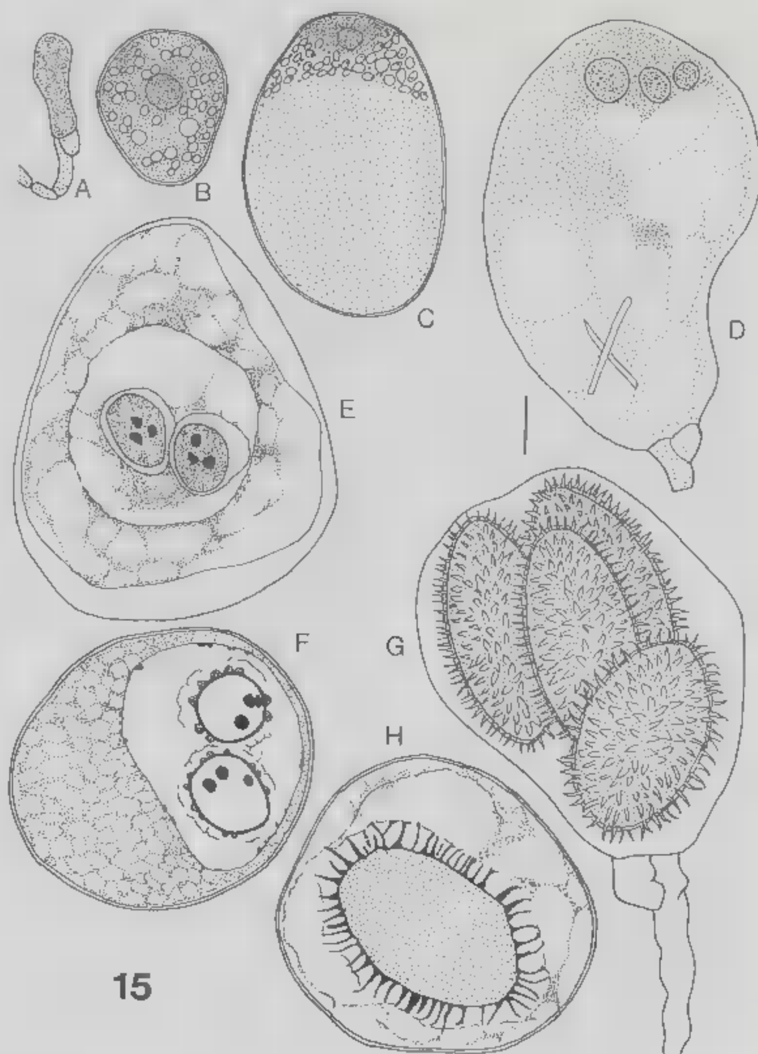


Fig. 15, A-H: évolution et structure des asques (microscopie photonique). G (montage dans l'eau) est une figure inédite de M. Chadefaud. Colorations: bleu Coton (D), hématoxyline (E, H), lugol (A), pyronine (B, C, F). Echelle: 10μm.

Fig. 15, A-H : evolution and structure of asci (light microscope). G (water mounting) is an unpublished drawing of M. Chadefaud. Stains used are Coton blue (D), haematoxylin (E, H), lugol (A), pyronine (B, C, F). Scale: 10μm.

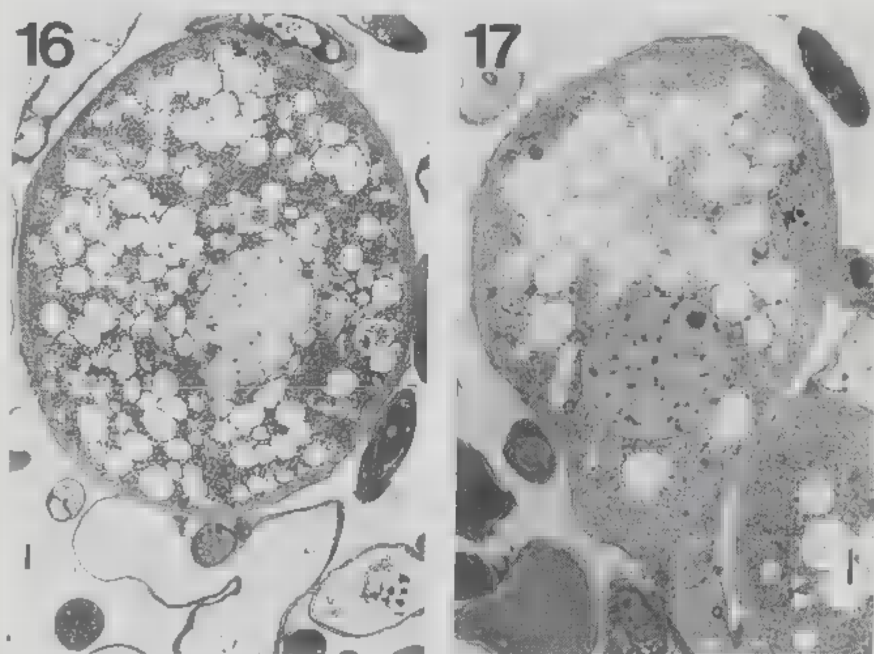


Fig. 16 et 17 : jeunes asques uninucléés, globuleux; noter l'évolution dans la répartition des vacuoles (microscopie électronique). Echelle: 1µm.

Fig. 16 and 17 : young uninucleate globular asci; note changing of vacuole localization (electron microscope). Scale: 1µm.

contenu ascal est fortement vacuolisé. Au stade figuré chaque ascospore contient plusieurs globules lipidiques et sa paroi comporte une périspore, d'épaisseur irrégulière; les périspores des différentes ascospores sont indépendantes et toujours clairement distinctes du sac postsporal.

A un stade un peu plus avancé de son évolution, la paroi ascosporale porte des mamelons fortement colorables (Fig. 15F) qui représentent le début de son ornementation. Sur les coupes semi-fines la pyronine colore fortement des granules de taille variable disposés sur le trajet du sac postsporal.

L'asque adulte, de forme sub-globuleuse (90-140 x 80-120µm) et porté par un pied souvent assez long, pourvu d'une anse dangeardienne (Fig. 15G), contient un nombre variable d'ascospores (de 1 à 6, le plus souvent 4), autour desquelles le sac postsporal n'est plus distinct. De forme elliptique (30-40 x 22-30µm), les ascospores présentent une paroi brune hérissée

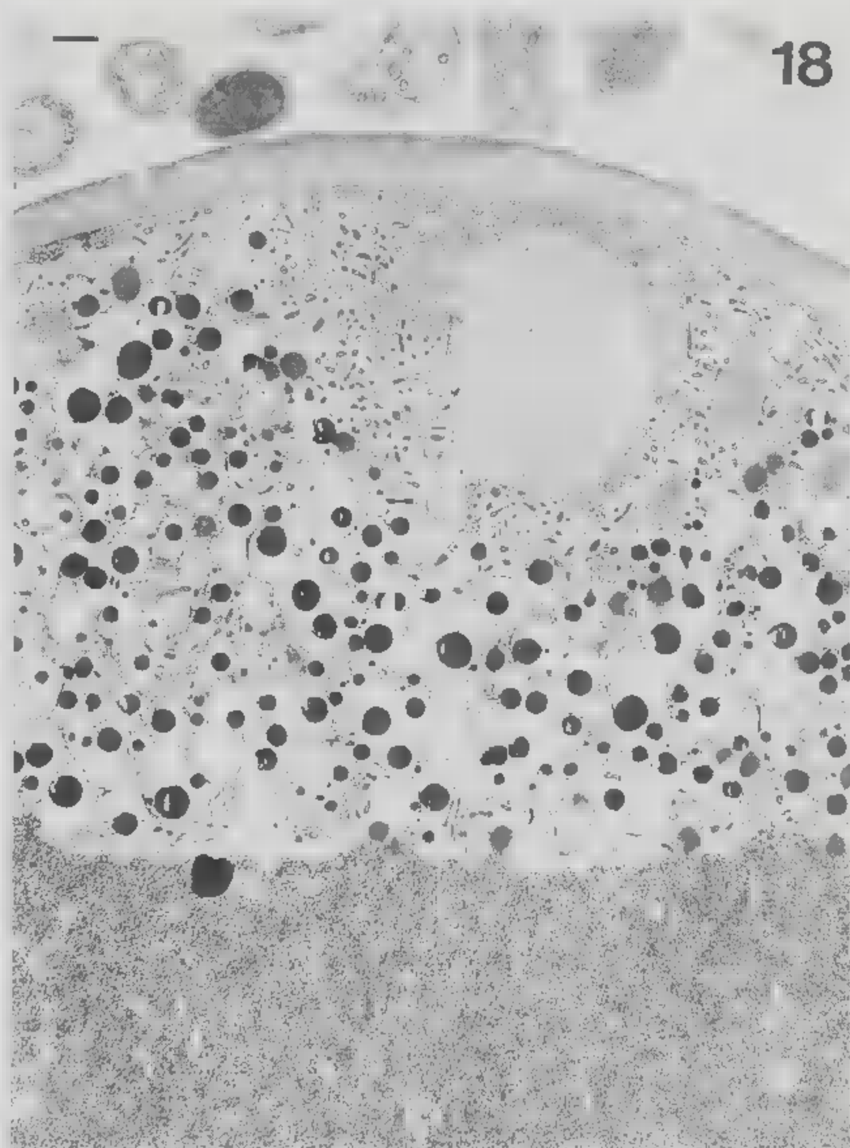


Fig. 18 : asque uninucléé avec zonation horizontale précédant l'ascosporogénèse (microscopie électronique). Echelle: 1µm.

Fig. 18 - uninucleate ascus, typical polarity preceding ascosporogenesis (electron microscope). Scale: 1µm.

d'épines serrées, souvent légèrement courbes; les bases coniques jointives des épines sont bien visibles en coupe (Fig. 15H). Sur cette même figure, on notera que l'ascospore, ici unique dans l'asque, a des dimensions supérieures à la moyenne (40 x 25µm pour le seul corps sporal) et que le sac postsporal, vraisemblablement en voie de lyse, est fragmenté en segments disjoints.

III - ULTRASTRUCTURE DES ASQUES

Les stades d'évolution des asques suivis en microscopie photonique sont également identifiables sur les micrographies électroniques. Ainsi, l'asque uninucléé, primitivement allongé (Fig. 14) devient globuleux (Fig. 16): son contenu (noyau central, vacuoles éparses, cytoplasme riche en glycogène) contraste avec celui de la cellule sous-ascale, fortement vacuolisé. L'établissement de la zonation caractéristique du stade précédant l'ascosporogénèse se manifeste d'abord par le regroupement des vacuoles dans la partie sus-jacente au noyau (Fig. 17). Un peu plus tard, la stratification préalablement décrite est établie (Fig. 18): masse basale de glycogène, puis, au-dessus, couche à vacuoles dominantes et région sommitale à cytoplasme riche en organites (mitochondries notamment) autour du noyau, toujours unique.

Dans la couche où dominent les vacuoles est observable une évolution caractéristique qui se produit à l'approche de la division nucléaire et de l'ascosporogénèse qui s'ensuit. Entre les vacuoles, à contenu initialement clair, se différencient progressivement des petites masses ovoïdes à subsphériques, d'abord moyennement opaques aux électrons, puis très denses (Fig. 19a). La plupart d'entre elles sont progressivement incluses dans les vacuoles selon un processus qui peut être suivi sur la figure 19b. Les masses denses s'appliquent sur le tonoplaste des vacuoles en prenant la forme de calottes, puis elles le traversent et reprennent leur forme globuleuse primitive à l'intérieur des vacuoles, dont le tonoplaste est alors reconstitué.

Corrélativement à l'évolution du contenu ascal se produit, au stade de l'asque uninucléé, une complication de la paroi ascale qui, préalablement simple, devient double (Fig. 20a) : couche externe (= exoascus) mince et sombre, fortement réactive au test de Thiéry et couche interne (= endoascus) beaucoup plus épaisse et de densité moyenne. Les deux couches de la paroi ascale présentent une texture granuleuse tandis que la substance interascale apparaît sous forme de fibrilles, à orientation désordonnée. Ultérieurement, la paroi ascale se complique encore, une couche basale située contre le plasmalemme s'individualisant à l'intérieur de l'endoascus (Fig. 20b).

La polarité de l'asque se maintient au stade de la division du noyau unique (Fig. 21) puis lors de l'ascosporogénèse (cf. Parguey-leduc & Janex-Favre, 1981). La figure 22 montre un sommet d'asque où sont présents

conjointement de jeunes ascospores et des noyaux : inutilisés lors de l'ascosporogénèse, ceux-ci sont probablement en voie de dégénérescence, ce qui explique le nombre limité d'ascospores à l'intérieur de l'asque.

Le stade où les ascospores en voie de maturation sont groupées au centre de l'asque, à l'intérieur du sac postsporal, est aisément identifiable en microscopie électronique (Fig. 23). Le contraste entre les deux régions délimitées par le sac est particulièrement évident : à ce stade, à l'extérieur, entre la paroi ascale et le sac postsporal (flèche), l'épiplasme contient essentiellement du glycogène tandis qu'à l'intérieur, autour des ascospores, sont visibles les vacuoles à masse globuleuse dense. Le sac postsporal lui-même (flèche) est souligné, sur sa face externe, par de petites masses globuleuses opaques aux électrons et réactives au test de Thiéry, qui fait apparaître un liseré limitant plus fortement noirci (Fig. 24). Ainsi que nous l'avons indiqué en rapportant nos observations en microscopie photonique, l'ectospore (*ec*) limitant la périspore (*pe*) de chaque ascospore est parfaitement distincte du sac postsporal (flèche, Fig. 25) et ne peut en conséquence être impliquée dans la formation de celui-ci.

CONCLUSION

L'étude approfondie des ascocarpes du *T. melanosporum* nous permet d'apporter ici diverses précisions sur l'appareil sporophytique, dont l'observation est délicate et la cytologie souvent encore mal connue. Ainsi, nous avons pu confirmer la subdivision du sporophyte en deux phases, reconnues chez les Ascomycètes par Chadefaud depuis 1944: première phase prosporophytique formée de vésicules plurinucléées et deuxième phase ascosporophytique composée d'hyphes à cellules dicaryotiques bourgeonnées par les vésicules; celles-ci produisent à leur extrémité, au moyen de dangeardies ascogènes, des cellules proascales, également dicaryotiques. Ces dernières se transforment en asques par fusion de leurs deux noyaux.

Les asques du *T. melanosporum* ont une organisation tout à fait conforme à celle des espèces de *Tuber* décrites antérieurement (Parguey-Leduc & Janex-Favre, 1977, 1981). Ses caractères les plus originaux sont:

- la forme globuleuse du corps de l'asque: celle-ci est acquise dès le stade uninucléé : la forme allongée de la cellule proascale n'est en effet conservée que peu de temps après la fusion des deux noyaux;

- la polarité dans la répartition des constituants internes: elle s'établit au stade uninucléé et se modifie au cours de l'évolution de l'asque. Au moment où le noyau de fusion est sur le point de se diviser, préalablement à l'ascosporogénèse, elle est horizontale, la zone sporogène se localisant au sommet de l'asque. Cette première zonation disparaît lorsque les jeunes ascospores ont achevé la différenciation de leur paroi primaire et commencent à acquérir leur paroi secondaire. Elles tendent alors à se regrouper au

centre de l'asque, à l'intérieur d'un sac postsporal, ce qui détermine une nouvelle zonation, concentrique;

- le mécanisme de l'ascosporogénèse: rappelons ses caractères originaux, décrits récemment chez le *T. melanosporum* (Parguey-Leduc et al., 1987a, 1988) et analogues à ceux déjà rapportés chez le *Tuber aestivum* (Janex-Favre & Parguey-Leduc, 1976; Parguey-Leduc & Janex-Favre, 1977). Chez ces deux espèces les ascospores sont délimitées individuellement au sommet de l'asque, à partir de diverticules lomasomiens, et non à partir d'une vésicule ascale, comme c'est le cas chez les autres Eu-Ascomycètes; ce mode de différenciation rappelle le type d'ascosporogénèse rencontré chez les Hémi-Ascomycètes où les ascospores sont également formées indépendamment les unes des autres, mais suivant des modalités différentes, mettant en jeu le disque astérien;

- la structure de la paroi ascale: les deux couches qui la composent classiquement n'ont pas la complexité de celles des autres Discomycètes,

Fig. 19 et 20 : détails d'asques immatures (microscopie électronique). Fig. 19, a et b: formation et incorporation dans les vacuoles de masses denses aux électrons; Fig. 20, a et b (technique de Thiéry): évolution de la paroi ascale. Echelle: 0,25µm.

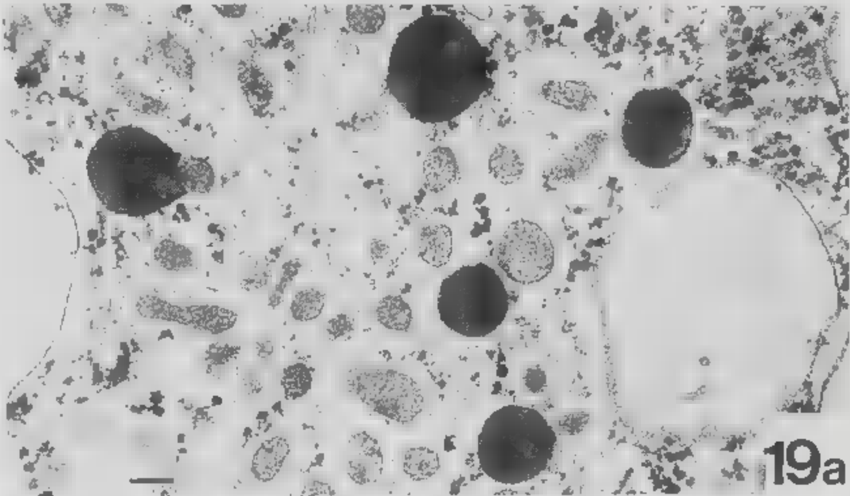
Fig. 19 and 20 : close up of nonmature asci (electron microscope). Fig. 19, a and b: electron opaque bodies incorporating in clear vacuoles; Fig. 20, a and b (Thiéry's technique): evolution of ascal wall. Scale: 0,25µm.

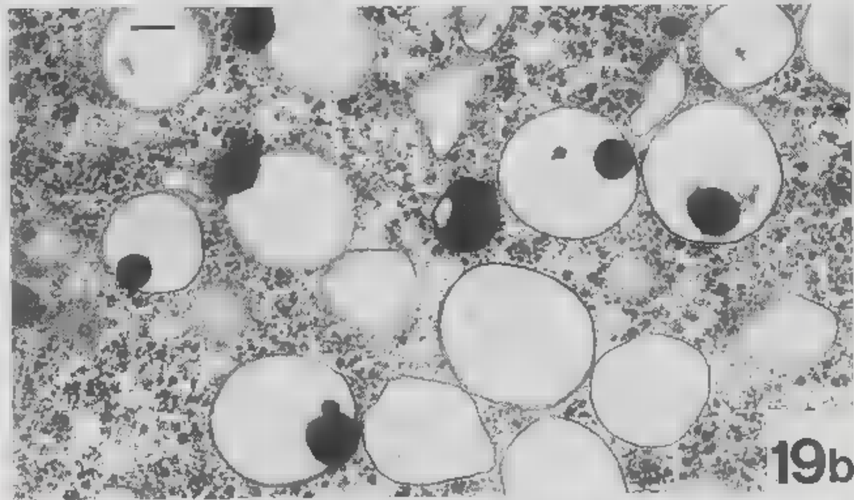
Fig. 21 et 22 : sommets d'asques au moment de l'ascosporogénèse (microscopie électronique, technique de Thiéry). Fig. 21: asque plurinucléé; Fig. 22: jeunes ascospores et noyaux probablement abortifs. Echelle: 1µm.

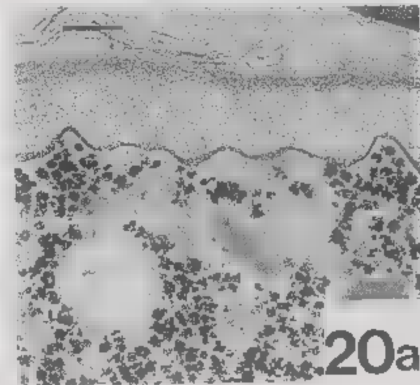
Fig. 21 and 22 : apical portion of ascus during ascosporogenesis (electron microscope, Thiéry's technique). Fig. 21: multinucleate ascus; Fig. 22: young ascospores and likely abortive nuclei. Scale: 1µm.

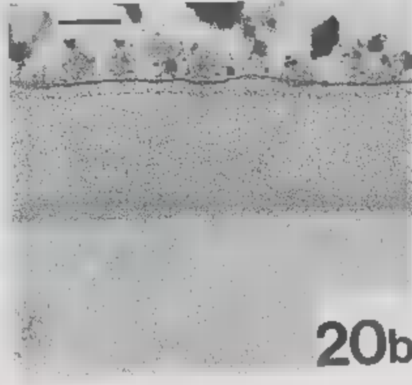
Fig. 23-25 : sac postsporal et zonation concentrique dans un asque sub-adulte (microscopie électronique). Fig. 23: vue d'ensemble; Fig. 24 (technique de Thiéry): détail du sac postsporal et de ses masses globuleuses; Fig. 25: détail du sac postsporal et de la paroi ascosporale. *ec*: ectospore; *pa*: paroi ascale; *pe*: périspore; les flèches indiquent le sac postsporal. Echelle: 1µm.

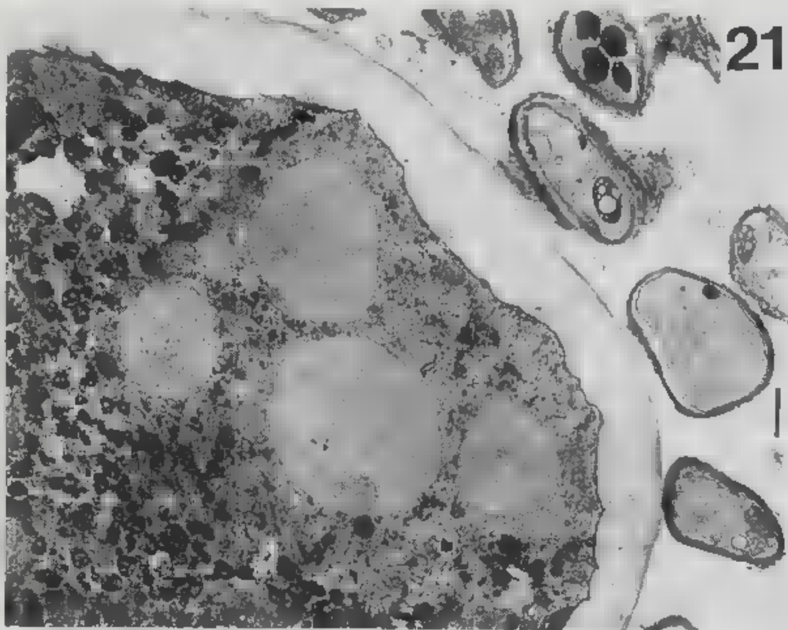
Fig. 23-25 : postsporal membrane and concentric zonation in sub-adult ascus (electron microscope). Fig. 23: general view; Fig. 24 (Thiéry's technique): close-up of postsporal membrane with globular bodies; Fig. 25: close-up of postsporal membrane and ascospore wall. *ec*: ectospore; *pa*: ascus wall; *pe*: perispore; arrows point to the postsporal membrane. Scale: 1µm.

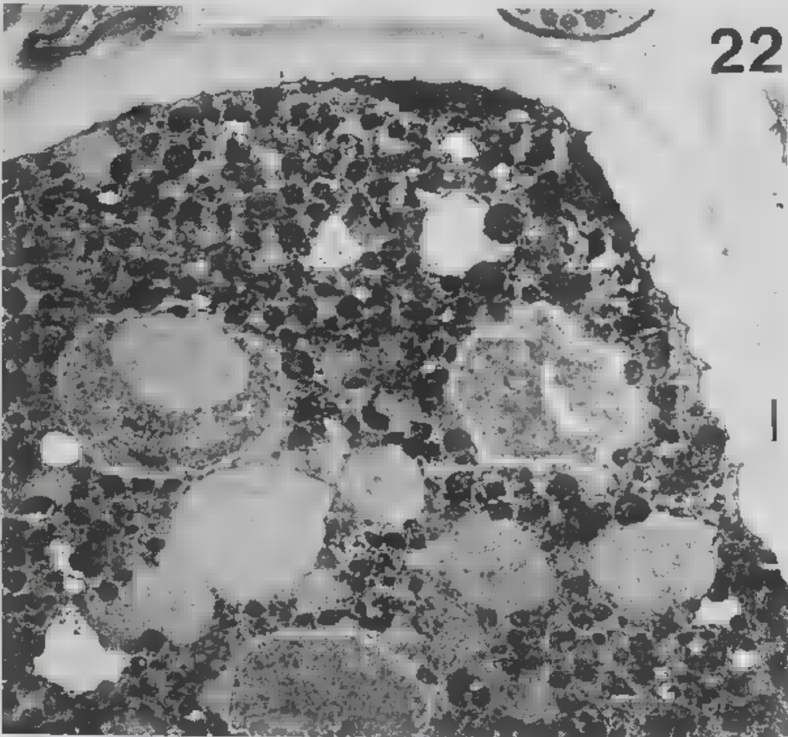

19a

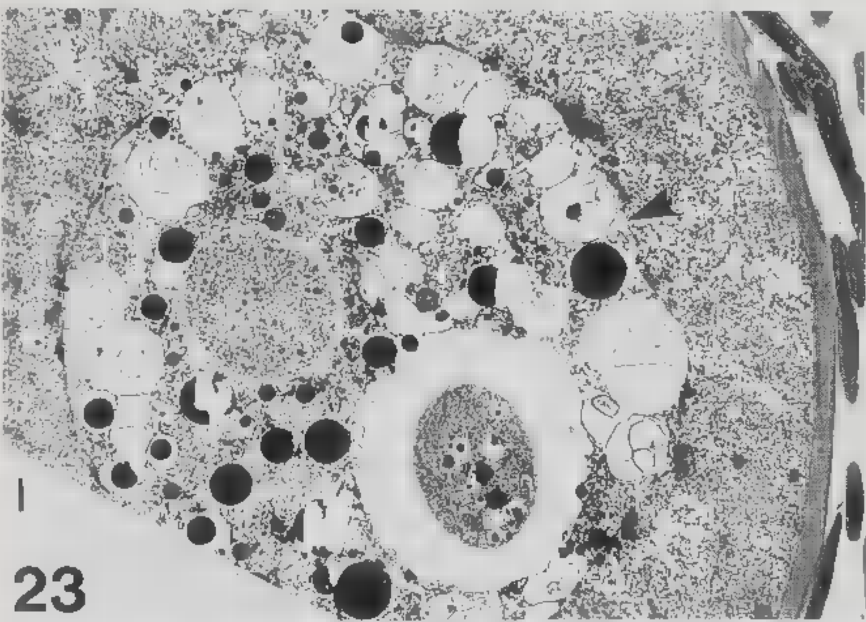

19b

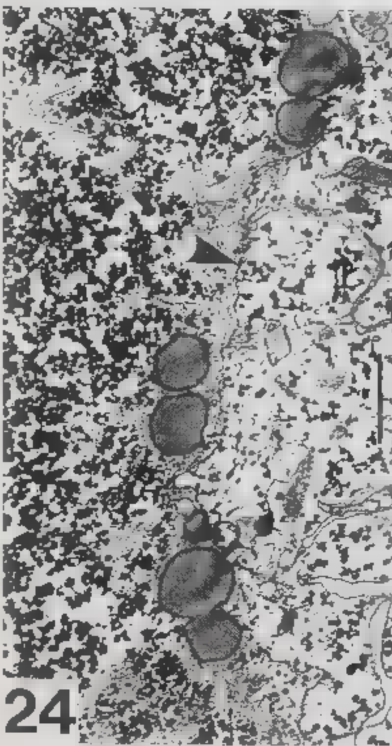

20a

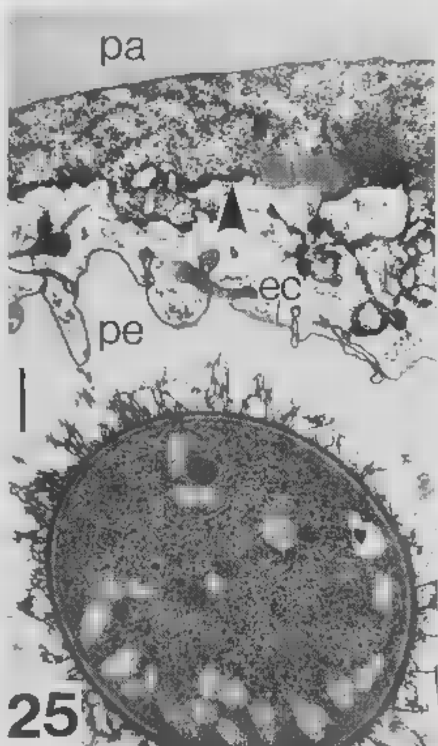

20b


21


22


23


24


pa
ec
pe
25

lichénisés ou non (Bellemère, 1975, 1977; Bellemère & Hafellner, 1982, 1983; Bellemère et al., 1986a et b).

- la paroi ascosporale, complexe et ornementée (Parguey-Leduc et al., 1987a).

Certaines de ces particularités des asques des *Tuber* ont également été trouvées chez divers *Terfezia* (Janex-Favre & Parguey-Leduc, 1985; Janex-Favre et al., 1988), ce qui confirme l'originalité de ces deux genres hypogés au sein des Discomycètes. Celle-ci ne se limite d'ailleurs pas aux caractères ascaux mais porte également sur l'organisation de l'ascocarpe, avec notamment l'absence d'un hyménium typique. Ceci incite à conserver, au moins pour ces deux genres très proches, l'ordre des Tubérales comme ordre distinct au sein des Discomycètes.

REMERCIEMENTS

Nous remercions B. DARCHEN (Station biologique des Eyzies), R. GLEIZE (Valréas) et M. KULIFAJ (Université Paul Sabatier de Toulouse) qui nous ont aimablement procuré les échantillons, ainsi que M. AVNAIM, J. BIDOUX, C. FOURNIGAULT et N. JAMPSIN pour leur collaboration technique compétente et amicale.

Avec le concours financier du Conseil Régional de Midi-Pyrénées (décision n° 86 005325/Déc.) auquel nous exprimons nos remerciements.

BIBLIOGRAPHIE

BELLEMÈRE A., 1975 - Etude ultrastructurale des asques : la paroi, l'appareil apical, la paroi des ascospores chez des Discomycètes inoperculés et des Hystériales. *Physiol. Vég.* 13: 393-406.

BELLEMÈRE A., 1977 - L'appareil apical de l'asque chez quelques Discomycètes: étude ultrastructurale comparative. *Rev. Mycol. (Paris)* 41: 233-264.

BELLEMÈRE A. et HAFELLNER J., 1982 - Etude ultrastructurale des asques bituniqués de l'*Hysterographium fraxini* (Pers. ex Fr.) de Not. (Ascomycètes, Hystériales): développement de la paroi et déhiscence. *Cryptogamie, Mycol.* 3: 262-286.

BELLEMÈRE A. et HAFELLNER J., 1983 - L'appareil apical des asques et la paroi des ascospores du *Catolechia wahlenbergii* (Ach.) Flotow ex Koerber et de l'*Epilichen scabrosus* (Ach.) Clem. ex Haf. (Lichens, Lécanorales): étude ultrastructurale. *Cryptogamie, Bryol. Lichénol.* 4: 1-36.

BELLEMÈRE A., HAFELLNER J. et LETROUIT-GALINOU M.A., 1986a - Ultrastructure et mode de déhiscence des asques chez les Lichens des genres *Teloschistes* et *Apatoplaca* (Teloschistaceae). *Cryptogamie, Bryol. Lichénol.* 7, 189-211.

BELLEMÈRE A., MALHERBE M.C., CHACUN H. et HAFELLNER J., 1986b - Etude ultrastructurale des asques et des ascospores chez les espèces lichénicoles non lichénisées *Abrothallus bertianus* de Not. et *A. parmeliarum* (Sommerf.) Nyl. *Cryptogamie, Mycol.* 7: 47-85.

CHADEFAUD M., 1944 - *Biologie des Champignons.* Paris, Gallimard, 267p.

CHADEFAUD M., 1952 - Sur le cycle sexuel des organismes eucaryotes et son évolution. *Rev. Sci.* 90: 49-57.

CHADEFAUD M., 1953a - Les hyphes à anses latérales des Eumycètes et les affinités floridéennes de ces Champignons. *Oesterr. Bot. Z.* 100: 515-532.

CHADEFAUD M., 1953b - Le cycle et les sporophytes des Ascomycètes. *Bull. Soc. Mycol. France* 69: 199-219.

CHADEFAUD M., 1960 - Les végétaux non vasculaires (Cryptogamie). *In*: M. CHADEFAUD & L. EMBERGER. *Traité de Botanique Systématique.* Tome I. Paris, Masson, XV + 1018p., 713 fig.

CHADEFAUD M., 1976 - Hétérobasides, basides urniformes et homobasides; archéobasides et asques. *Bull. Soc. Mycol. France* 92: 135-146.

CHAZE J., 1950 - Sur la formation du périthèce et d'un appareil conidien chez *Tuber melanosporum* en culture pure. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.* 230: 859-861.

DANGEARD P.A., 1894 - La reproduction sexuelle des Ascomycètes. *Le Botaniste* 4: 21-58.

GREIS H., 1938 - Die Sexualvorgänge bei *Tuber aestivum* und *Tuber brumale*. *Biol. Zentralbl.* 68: 617-631.

JANEX-FAVRE M.C. et PARGUEY-LEDUC A., 1976 - La formation des ascospores chez deux Truffes: *Tuber rufum* Pico et *Tuber aestivum* Vitt. (Tubéracées). *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.*, sér. D, 283: 1173-1175.

JANEX-FAVRE M.C. et PARGUEY-LEDUC A., 1985 - Les asques et les ascospores du *Terfezia claveryi* Ch. (Tubérales). *Cryptogamie, Mycol.* 6: 87-99.

JANEX-FAVRE M.C., PARGUEY-LEDUC A. et RIOUSSET L., 1988 - L'ascocarpe hypogé d'une Terfez française (*Terfezia leptoderma* Tul., Tubérales, Discomycètes). *Bull. Soc. Mycol. France* 104: 145-178.

KULIFAJ M., 1984 - *Tuber melanosporum* Vitt.: contribution à l'étude de la morphogénèse et de la physiologie de l'ascocarpe. Thèse de spécialité, Université Paul Sabatier, n° 2979, Toulouse.

MARCHISIO V., 1964 - Sulla cariologia degli aschi e delle spore di *"Tuber maculatum"* Vitt. *Allionia* 10: 105-113.

MONTANT C., KULIFAJ M. et GLEIZE R., 1983 - Note sur la récolte de jeunes ascocarpes du *Tuber melanosporum* Vitt. (Truffe noire du Périgord) et leur évolution. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.*, sér. III, 296: 463-468.

PARGUEY-LEDUC A. et JANEX-FAVRE M.C., 1977 - L'organisation des asques de deux Truffes: *Tuber rufum* Pico et *Tuber aestivum* Vitt. *Rev. Mycol. (Paris)* 41: 1-32.

PARGUEY-LEDUC A. et JANEX-FAVRE M.C., 1981 - Etude ultrastructurale des asques et des ascospores de Truffes du genre *Tuber*. I. Les asques. *Cryptogamie, Mycol.* 2: 37-43.

PARGUEY-LEDUC A., JANEX-FAVRE M.C. et MONTANT C., 1988 - L'ascocarpe du *Tuber melanosporum* Vitt. (Truffe noire du Périgord, Discomycètes): structure de la glèbe. I. Les veines fertiles. Secondo Congresso internazionale sul Tartufo, Spoleto 24-27 novembre 1988 (sous presse).

PARGUEY-LEDUC A., JANEX-FAVRE M.C., MONTANT C. et KULIFAJ M., 1989 - Ontogénie et structure de l'ascocarpe du *Tuber melanosporum* Vitt. (Truffe noire du Périgord, Discomycètes). *Bull. Soc. Mycol. France* 105: 227-246.

PARGUEY-LEDUC A., MONTANT C. et KULIFAJ M., 1984 - Structure et évolution de l'ascocarpe du *Tuber melanosporum* Vitt. (Truffe noire du Périgord). *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.*, sér. III, 299: 315-320.

PARGUEY-LEDUC A., MONTANT C. et KULIFAJ M., 1985 - Le stade apothécioïde de l'ascocarpe du *Tuber melanosporum* Vitt. (Truffe noire du Périgord). *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.*, sér. III, 301: 143-145.

PARGUEY-LEDUC A., JANEX-FAVRE M.C. et MONTANT C., 1987a - Formation et évolution des ascospores de *Tuber melanosporum* (Truffe noire du Périgord, Discomycètes). *Canad. J. Bot.* 65: 1491-1503.

PARGUEY-LEDUC A., MONTANT A. et KULIFAJ M., 1987b - Morphologie et structure de l'ascocarpe adulte du *Tuber melanosporum* Vitt. (Truffe noire du Périgord, Discomycètes). *Cryptogamie, Mycol.* 8: 173-202.

THIERY J.P., 1967 - Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Microscop.* 6: 987-1018.



ANALYSES BIBLIOGRAPHIQUES

HARRINGTON T.C and COBB F.W., Jr., 1988 - Leptographium Root Diseases on Conifers. St Paul, Minnesota, APS Press, 149p. (Symposium series).

La série des ouvrages rapportant le contenu des symposiums organisés par la Société Américaine de Phytopathologie à l'échelle du continent nord-américain vient de s'enrichir d'un mémoire sur les maladies racinaires des conifères, induites par des *Leptographium*. Les ouvrages de cette série se distinguent par un format réduit et un mode de reproduction directe de textes dactylographiés. Le symposium sur ces maladies racinaires particulières s'est tenu en 1985, suite à une recommandation faite en 1978 par le Comité de Pathologie Forestière de la Société. A noter que les travaux imprimés en 1988 intègrent les observations publiées entre ces deux dates.

C'est à partir des années soixante que les champignons du genre *Leptographium*, les entités génériques voisines et leurs téléomorphes, ont fait l'objet d'un intérêt croissant de la part des phytopathologues forestiers, et cela pour trois raisons principales. Ces dernières résultent, d'une part, de la découverte de l'importance du rôle de pathogène majeur de ces champignons à l'encontre de certaines espèces d'arbres forestiers en Amérique du Nord, et des interactions écologiques particulières révélées par ces mêmes champignons avec divers insectes vecteurs. D'autre part, les téléomorphes et anamorphes du groupe fongique *Verticicladiella sensu lato* présentent des liens taxonomiques complexes qui ont entravé la recherche de solutions à ces affections racinaires; cette situation se reflète dans la variabilité des concepts génériques prévalants pour cet ensemble de champignons et qui confirme la nécessité de poursuivre des travaux à caractère fondamental.

Les différents aspects des maladies racinaires des conifères sont couverts dans ce petit ouvrage instructif qui aboutira à focaliser l'attention sur les intriguants problèmes biologiques et théoriques posés par ces affections complexes et les organismes associés à eux. Les six chapitres qui le composent traitent de la distribution des espèces de *Leptographium*, des hôtes et des insectes vecteurs. On trouve aussi une synthèse de la biologie du *L. wageneri* sur deux variétés de Pin et également de la biologie et évolution de la maladie racinaire tache noire du Sapin Douglas. Le quatrième chapitre traite des espèces de *Leptographium* associées aux affections racinaires des conifères en Colombie Britannique. Il est suivi par une étude du rôle pathogène de *L. procerum* sur les Pins et une analyse des perspectives internationales des *Leptographium* pathogènes des racines des conifères. La bibliographie de

l'ensemble des travaux représente 240 titres, et est sans contexte exhaustive pour les sujets abordés.

J. Mouchacca

PEARSON R.C. and GOHEEN A.C., 1988 - Compendium of Grape diseases. St Paul, Minnesota, APS Press, 93p., 30 fig. trait, 188 fig. couleur.

Ce compendium des Maladies de la Vigne est l'un des derniers nés d'une série de manuels, parus sous l'égide de la Société Américaine de Phytopathologie et consacrés aux maladies de certaines cultures agricoles ou horticoles. Les mémoires précédents ont établit un style informatif préemptoire, souvent de portée internationale, que l'on retrouve également dans cet ouvrage. D'ailleurs, l'examen de l'importante liste des personnes ayant participé, à des degrés divers, à la réalisation de ce Compendium, confirme que ce manuel est la synthèse des compétences de spécialistes originaires de toutes les régions du monde où se pratique la culture de cette plante y compris la Chine et l'Australie.

L'ouvrage comporte une introduction traitant de la biologie de la vigne, accompagnée de quelques notes préliminaires sur les pathogènes connus et des informations, de nature historique, sur les liens existant entre ces derniers et cette plante particulière. La première section représente la majeure partie de l'ouvrage; elle développe les maladies induites par des facteurs biotiques: affections des divers organes de la vigne résultant de l'activité des champignons, des bactéries et organismes affines, des virus et des nématodes. La seconde concerne les dégâts provoqués par certains acariens et insectes. Vient ensuite le chapitre des maladies ayant pour origine des facteurs abiotiques, celui de l'impact des pratiques culturales sur les maladies de la vigne et, enfin, une analyse des techniques de sélection des variétés et des règles législatives définissant les caractéristiques respectives des cépages et leur mode de propagation. Le Compendium se termine par un appendix donnant les termes descriptifs anglais des maladies de la vigne en plusieurs langues: français, allemand, italien et espagnol, suivi d'un glossaire et d'un index.

Dans les diverses sections, chaque maladie ou affection est décrite avec précision par ses symptômes, avec indication de l'agent causal, des modalités du cycle de l'affection, de son épidémiologie et des moyens de contrôle de la maladie; sont également fournies quelques références bibliographiques majeures. Des figures au trait des organismes responsables illustrent la plupart des cas et ce type d'information se trouve largement conforté par un ensemble de 188 figures en couleur regroupées en 28 pages au centre de l'ouvrage. L'iconographie en couleur est, dans l'ensemble, d'excellente qualité.

Les caractéristiques de ce Compendium perpétuent la tradition de haute qualité de présentation et de niveau scientifique révélée par les numéros

précédents de cette série. Sans aucun doute, cet ouvrage sera largement et pour longtemps consulté par tous les producteurs de raisins, les viticulteurs et les industriels gravitant autour de la culture de la vigne et des produits dérivés des raisins.

J. Mouchacca

CLARK C.A. and MOYER J.W., 1988 - Compendium of sweet potato diseases. St Paul, Minnesota, APS Press, 74p.

Ce compendium de 74 pages, avec 74 photos en couleur et 53 fig., est le résultat d'une grande coopération scientifique signalée dans la préface. Après l'introduction résumant l'importance de la culture et des maladies de cette plante, la 1ère partie de cet ouvrage est consacrée aux maladies infectieuses bactériennes, puis fongiques: du sol (*Sclerotinia*, *Rhizoctonia*...), foliaires (*Alternaria*, *Cercospora*, *Phyllosticta*, *Septoria*, *Coleosporium*, *Sphaceloma*, *Albugo*...), des tubercules (*Ceratocystis*, *Sclerotium*, *Rhizoctonia*, *Macrophomina*, *Streptomyces*, *Plenodomus* (*Phomopsis*), *Fusarium* (diverses espèces), *Pythium*, *Phymatotrichum*, *Monilochaetes*, *Helicobasidium*, *Rhizopus*, *Botryodiplodia*, *Diplodia*, *Diaporthe*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Botrytis*...). Suivent les maladies dues aux nématodes (*Meloidogyne*, *Rotylenchulus*, *Pratylenchus*, *Ditylenchus*, *Belonolaimus*, *Paratrichodorus*...), et les viroses (SPFMV, SPLV, SPMMV, SPYDV, SPCV...).

Parmi les désordres non infectieux (2ème partie), nous signalons les mutations somatiques et leurs effets, les dégâts de l'environnement: eau, température, soleil (trop ou trop peu), les dégâts des herbicides, les déficiences et toxicité de nutrition (décrites par élément).

Toutes ces données sont exposées nettement, avec photo ou figure claire, avec symptômes et cycle du pathogène, évolution de la maladie, de l'épidémie et son contrôle. Elles sont complétées par une bibliographie sur chaque maladie. Un glossaire et un index terminent ce compendium d'une très grande valeur pour les enseignants et pour les usagers de cette culture.

Ch. Zambettakis †

WYLLIE T.D. and SCOTT D.H., 1988 - Soybean diseases of the North Central Region. St Paul, Minnesota, APS Press, 149p.

C'est la contribution de plusieurs auteurs très spécialisés dans les disciplines traitées qui donne la valeur de cet ouvrage pour les détails et les nouveautés scientifiques: Barnes explique justement dans le 1er chapitre l'intérêt d'une telle composition interdisciplinaire des articles.

Abney & Polper analysent les dernières données sur les maladies des semences, Ferriss étudie leur épidémiologie, Henning les traitements. McGee évalue les méthodes de contrôle, plus spécialement pour *Phomopsis*, tandis

que Hill analyse les recherches sur la détection des pathogènes, et que Sauer conclue sur la valeur et la qualité des grains.

Les maladies de la plante sont commentées en général par Kennedy et par Dunleavy. Plus spécialement, Smith & Backman étudient *Diaporthe phaseolorum (Phomopsis sojae)*, Grau: *Sclerotinia sclerotiorum (Whetzelinia)*, Scott: le syndrome SDS, lié probablement au *Pseudomonas*, Schmitthenner: *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. Deux articles concernent les Nématodes: Edwards et Niblack, pour *Heterodera glycines*. Un intérêt spécial est donné à l'anthracnose: *Colletotrichum truncatum (Glomerella cingulata)* par Sinclair, et le complexe *Diaporthe/Phomopsis* par le même auteur. La résistance est étudiée par Tachibana pour *Phialospora gregata*, par Wyllie pour *Macrophomina phaseolina* tandis que Lockwood synthétise les travaux permettant d'obtenir une résistance, au moins partielle, et de stopper les épidémies.

Ces différents articles ne font pas un ensemble cohérent, mais donnent les idées et les résultats personnels des chercheurs cités. A noter, une intéressante bibliographie, riche de 572 références concernant les auteurs américains, mais on peut regretter l'absence des recherches récentes européennes.

Ch. Zambettakis †

PEDERBY J.F., 1987 - *Penicillium* and *Acremonium*. Biotechnology handbooks 1. NY & London, Plenum Press, 297 p.

Le but de la collection est de fournir l'information nécessaire pour suivre l'évolution des connaissances des microorganismes utilisés dans les biotechnologies et leur exploitation dans l'industrie d'aujourd'hui.

Ce manuel se propose de traiter deux genres de champignons: *Penicillium* et *Acremonium* afin que l'utilisateur puisse à la fois identifier le matériel sur lequel il travaille et trouver un guide pratique pour sa maîtrise et son exploitation. Ces deux genres, taxonomiquement assez éloignés, sont regroupés dans l'ouvrage sur le critère de leur aptitude commune à produire des métabolites proches et économiquement importants, les molécules beta-lactame penicilline et cephalosporine. Le premier chapitre traite de la taxonomie des *Penicillium* et *Acremonium*. Il souligne l'intérêt de procéder à des identifications correctes et à l'étude rigoureuse du matériel biologique. Les autres chapitres portent sur les aspects physiologiques, biochimiques et génétiques des procédés où interviennent les genres en question.

Concernant les apports du chapitre 1, on peut douter que sous une forme à la fois si résumée et chargée de détails inutiles, un microbiologiste industriel ou universitaire puisse parvenir à une identification correcte. On ne voit pas en particulier, de recommandations concernant la variabilité des espèces, ni l'influence des milieux de culture pourtant si importants pour

une identification précise. Les facteurs morphogénétiques analysés et discutés sont intéressants. Par contre les données écologiques sont sommaires puisque limitées à la pathogénie et aux exigences trophiques de quelques espèces. Le chapitre 3 traite de la génétique des *Penicillium*, en particulier *P. chrysogenum*, d'une façon très résumée: mutations, recombinaisons somatiques et RNA recombinant. On trouve d'intéressants commentaires sur l'obtention de recombinants interspécifiques entre *P. baarnense* et *P. chrysogenum*, obtenus par fusion de protoplastes, capables de synthétiser de la penicilline. A propos de la génétique des *Acremonium*, les auteurs signalent les difficultés de la manipulation de ce champignon dont les études remontent à une dizaine d'années. Ils analysent de façon détaillée comment on peut isoler des mutants, le cycle parasexuel et la génétique de la production de la cephalosporine C. Les chapitres 6 et 7 sont ceux qui correspondent le mieux aux buts fixés par les éditeurs. Il y est traité de la biochimie et de l'enzymologie associées aux voies de biosynthèse de la penicilline et de la cephalosporine. Les mécanismes d'action de la penicilline N synthétique et l'ouverture enzymatique du cycle sont exposés. Les auteurs proposent aussi quelques voies possibles pour la production artificielle des deux antibiotiques avec des chaînes latérales autres que l'acide α aminoadipique. Dans le chapitre 6 on trouve la liste des métabolites secondaires produits par les *Penicillium*; les possibilités de biosynthèse des *Talaromyces* et *Eupenicillium* sont également abordées. Les auteurs établissent avec raison une relation très claire entre divers aspects de la biologie des *Penicillium*, les affinités interspécifiques et les relations phylogénétiques à partir des origines biosynthétiques des métabolites secondaires. Le chapitre 7 traite de l'aptitude des *Penicillium* à produire des enzymes extracellulaires. L'utilisation de ces activités et des enzymes immobilisés est suggérée en même temps que le développement de l'ingénierie génétique pour une nouvelle exploitation économique de ces microorganismes.

Même si les chapitres sont un peu disparates et donnent des exposés forcément très résumés des différents aspects des questions traitées, l'ouvrage peut servir de base pour des chercheurs engagés dans la recherche sur ces antibiotiques fameux.

L. Bettucci

BON M., 1988 - *Pareys Buch der Pilze.* Über 1500 Pilze Europas davon 1230 in Farbe. Hamburg und Berlin, Verlag Paul Parey, 362p., ill. col. (Übersetzt und bearbeitet von Till R. Lohmeyer).

Publié d'abord en anglais, puis presque simultanément en français et en allemand, cet ouvrage est vite devenu indispensable à tous ceux qui, dans toute la partie occidentale de l'Europe, souhaitent nommer leurs récoltes de champignons. En effet, quels atouts ce nouveau guide mycologique ne possède-t-il pas? Un format "de poche" très pratique, une présentation assez aérée pour un contenu fort dense puisqu'on y trouve les descriptions de plus

de 1500 espèces et variétés, une illustration en couleurs abondante (près de 150 planches), remarquable de fidélité et de fraîcheur; par ailleurs, des conseils judicieux, de multiples renseignements, évidemment des clés de détermination ainsi que l'indication des noms scientifiques et de leurs éventuels synonymes. Voilà de quoi étudier les champignons dans de très bonnes conditions !

Présentant en introduction les données essentielles à la compréhension des textes, le livre offre également l'obligatoire chapitre sur les empoisonnements fongiques, inséré de façon plutôt inattendue entre l'explication sur la formation des "boucles" et le glossaire des termes techniques. Ce dernier, suivi de tableaux montrant les principales caractéristiques des basidiocarpes, vient compléter l'exposé des notions qu'il est nécessaire de connaître pour une observation macro- et microscopique précise des champignons. En outre, un modèle de fiche de récolte et de description donnera à chacun la possibilité d'organiser valablement son herbier.

Des clés générales conduisent à la reconnaissance des différents groupes tandis que d'autres, plus détaillées, permettent de distinguer les taxons de rang inférieur à la famille. A la suite du rappel de leurs caractères fondamentaux communs, les espèces, mentionnées sous le nom allemand ainsi que sous la combinaison latine avec ses auteurs, font l'objet d'une analyse lapidaire mais véritablement diagnostique, comportant souvent des remarques inédites dues à la grande expérience mycologique de l'Auteur. Chaque description est accompagnée du profil sporal et d'une représentation en couleurs. Cette illustration a été réalisée spécialement pour l'ouvrage, avec toute l'attention scientifique que demande une telle entreprise. C'est d'ailleurs là l'occasion de constater la supériorité, dans ce style de livre, du dessin et de l'aquarelle sur la photographie, en particulier lorsque cette dernière n'est pas excellente ou ne révèle pas l'aspect en quelque sorte "idéal" des carpophores d'une espèce.

On retrouvera, dans l'index qui complète le Guide, les noms de toutes les espèces examinées ou citées : communes ou plus rares, celles-ci se répartissent chez les Bolets, Russules, Lactaires, Entolomes, etc., jusqu'aux Lépiotes, Amanites, Gastéromycètes et Aphyllophorales, parmi les Ascomycètes et même les Myxomycètes. Les noms d'auteurs des appellations latines sont indiqués en tenant compte des règles et recommandations du Code International de Nomenclature Botanique. Toutefois, les dénominations traditionnellement utilisées ont été signalées et cette synonymie ne manque pas d'être appréciée. Bien sûr, il y a déjà eu - et il y aura encore - des changements dans ce domaine : les éditions ultérieures introduiront les modifications appropriées. D'un autre côté, on notera le soin extrême qui a présidé à la correction des textes, faisant disparaître les coquilles relevées dans les versions anglaise et française où, en particulier, les abréviations des noms d'auteurs sont parfois fantaisistes.

En bref, cet ouvrage renouvelle avec bonheur et sérieux la série des livres consacrés aux champignons. Peut-être d'un accès un peu difficile pour les débutants, il sera par contre le parfait vade-mecum de ceux qui ont déjà quelque connaissance du monde fongique et souhaitent augmenter leur savoir.

J. Perreau

DÖRFELT H., 1989 - Lexikon der Mykologie. Stuttgart, Gustav Fisher Verlag, 432p., 8pl. n. bl., 40pl. coul.

"Lexikon der Mykologie" est un dictionnaire dans lequel le mycologue averti ou même amateur peut trouver non seulement les termes employés en morphologie ou en systématique des champignons, mais encore ceux utilisés en phytopathologie, microbiologie, génétique, cytologie, écologie, physiologie et biochimie des champignons. Pour chaque terme expliqué et illustré par des exemples et ou des dessins, le domaine d'utilisation est mentionné. Une bibliographie sélective des travaux les plus récents dans les différents domaines de la mycologie complète ce lexique.

MICHAEL E., HENNIG B. & KREISEL H., 1988 - Handbuch für Pilzfreunde 6- Grosspilze Europas. Bestimmungsschlüssel. Gesamtregister der Band 1-5. Stuttgart, Gustav Fischer Verlag, 310p.

Ce sixième volume du manuel de mycologie édité par E. Michael, B. Hennig et H. Kreisel est le dernier de l'ouvrage. Il contient donc la table des matières des 5 premiers volumes. Les auteurs y ont ajouté des données complémentaires: brève histoire de la mycologie, clé des genres de champignons d'Europe, glossaire, liste des noms de genres reconnus et de leurs synonymes avec le type et des renvois bibliographiques pour chacun, classification des champignons et index des auteurs de taxons avec leurs abréviations. Ce sixième volume vient donc très utilement compléter les 5 premiers.

SAMSON R.A., EVANS H.C. and LATGE J.P., 1988 - Atlas of entomopathogenic Fungi. Berlin, Springer Verlag, 187p., 109pl., 16 fig.

Dans le domaine de la littérature scientifique, un "Atlas" est un ouvrage constitué d'illustrations avec légendes. L'ouvrage de Samson et al. est certes, un très bel atlas de champignons entomopathogènes; il comporte aussi plusieurs chapitres, de moindre extension, mais fort intéressants sur la biologie de ces champignons et leur utilisation.

Après l'historique de la connaissance du groupe, le chapitre 2 traite de la taxonomie des principaux genres (51) avec brève description de chacun d'eux et références bibliographiques afférentes. A cette partie descriptive succède une clef de détermination générique par groupe (Entomophtorales, Ascomycota, Deuteromycota).

Le chapitre 3 (107 pages) constitue le corps de l'ouvrage: l'Atlas. 109 taxa y sont illustrés à raison de 4 photos par taxon. Ces photos, en noir et blanc, prises au microscope optique, sont de bonne qualité mais de valeurs inégales quant à l'aide à la détermination des champignons par un non spécialiste. On connaît bien la difficulté de faire des photographies d'organismes dont les filaments sont généralement groupés en textures compactes, mais on regrette que quelques dessins au trait ne viennent pas expliciter les photographies. Groupées en tête de l'ouvrage, une trentaine de photos en couleur des champignons sur leurs hôtes sont beaucoup plus spectaculaires.

La pathologie des champignons vis-à-vis des insectes est abordée au chapitre 4. Malgré l'état moins avancé des connaissances dans ce domaine que dans celui des parasites des vertébrés, les données actuelles sur la fixation des spores sur la cuticule, leur germination et leur pénétration à l'intérieur de l'hôte sont exposées en même temps que les problèmes concernant les réactions immunitaires, la résistance des hôtes, l'agressivité des souches, etc. L'écologie et la biologie des champignons entomopathogènes sont étudiées (chapitre 5), tour à tour dans les écosystèmes primaires (inexploités) et les écosystèmes agricoles. Il s'agit de fort intéressantes considérations générales (bibliographiques et personnelles) et d'observations au champ plus que de données expérimentales. Après un exposé assez technique de la biotechnologie de production des mycopathogènes (principalement des spores), l'ouvrage se termine par un chapitre sur le contrôle biologique. Les auteurs y prennent le soin de préciser les définitions de termes couramment employés. Ils distinguent ainsi le "contrôle naturel" où les interactions insecte-champignon se produisent sans intervention volontaire des hommes, du "contrôle biologique" faisant intervenir la manipulation des organismes. La situation passée et actuelle, les résultats et les propositions pour l'avenir y sont successivement évoqués.

Les informations concernant les champignons entomopathogènes étaient jusqu'ici dispersées dans des revues spécialisées difficilement consultables par des chercheurs de specialités différentes quoique dans le même domaine, taxonomistes et biotechnologistes par exemple. Cet ouvrage a le mérite de réunir des données provenant d'horizons très disparates; il constitue un bilan qui intéressera non seulement les agriculteurs, les biotechnologistes, les entomologistes mais aussi les scientifiques de terrain ou de laboratoire pour lesquels il constituera un guide d'identification. Outre des considérations personnelles, originales, des spécialistes qui ont participé à la rédaction de cet "Atlas", on apprécie la richesse de la bibliographie (460 références) sur tous les aspects abordés.

M.F. Roquebert

INSTRUCTIONS AUX AUTEURS

D'une façon générale, la revue peut publier tous les travaux apportant une information fondamentale nouvelle, au plan de la systématique ou de la Biologie des Champignons. Le Comité de Lecture pourra susciter la rédaction d'articles de synthèse sur un sujet donné, ainsi que des mises au point bibliographiques périodiques.

Les manuscrits proposés à **CRYPTOGAMIE, Mycologie,** doivent être fournis en double exemplaire, dactylographiés à double interligne, sans rature ni surcharge. Outre la langue française, la revue accepte les articles rédigés en langue anglaise, allemande, espagnole. Chaque manuscrit devra comporter:
- le titre de l'article, dans la langue du manuscrit, et sa traduction en anglais;
- le titre courant (haut-de-page) de 50 signes au maximum;
- le nom et les prénoms des auteurs et leurs adresses;
- deux résumés, l'un dans la langue du manuscrit, l'autre en français ou en anglais, d'environ 180 mots ou 15 lignes, faisant ressortir les résultats essentiels exposés dans l'article;
- des mots-clés qui seront sélectionnés par le Comité de Lecture;
- des légendes explicites des figures, planches et tableaux dans la langue du manuscrit et en anglais (ou français);
- une liste bibliographique par ordre alphabétique des auteurs et chronologique par auteurs sans tenir compte des auteurs secondaires. Les titres des périodiques devront être abrégés suivant le B-P-H (Botanico-Periodicum-Huntianum, Pittsburg: Hunt Botanical Library, 1968), les ouvrages cités selon F.A. Stafleu & R.S. Cowan, 1976-... Taxonomic literature. Ed. 2 Utrecht/Antwerpen: Bohn, Scheltema & Holkema (*Regnum vegetabile* 94, 98, 105, 110...). Les références suivront les modèles suivants:

PATOUILLARD N., 1881 - Sur l'appareil conidial de *Pleurotus ostreatus*. *Bull. Soc. Bot. France* 27: 125.

HEIM R., 1957 - *Les champignons d'Europe*. Paris, Boubée et Cie, 2: 571 p.

MANDELS G.P., 1965 - Kinetics of fungal growth. *In :* G.C. AINSWORTH & A.S. SUSSMAN, *The fungi*. N.Y. & London, Academic Press, I: 599-612.

TEXTE. - La présentation du texte devra faire apparaître clairement ses subdivisions et leur hiérarchie, ainsi que le début des paragraphes (- insérer une ligne blanche *avant* les titres et sous-titres; - faire un alinéa de plus de 3 caractères au début de chaque paragraphe; - supprimer toute ligne blanche *entre* deux paragraphes et *après* les titres et sous-titres). Les renvois à la liste bibliographique se feront par le nom de l'auteur et l'année de publication (utiliser "et al." lorsque l'article est signé par plus de deux auteurs) et non par les renvois numériques. Les notes infrapaginales sont à éviter. La place des illustrations devra être indiquée dans la marge.

ILLUSTRATIONS. - Toutes les illustrations, y compris les tableaux, doivent être des originaux de qualité suffisante pour la reproduction directe en offset. Elles devront comporter les échelles (les grandissements x ... sont prohibés), les symboles nécessaires à leur compréhension, et être numérotées dans l'ordre d'appel dans le texte. Les tableaux devront être dactylographiés clairement, sans rature ni surcharge, en s'assurant de la qualité de la frappe. Les documents photographiques doivent être montés par planches. Les dimensions des originaux ne devront pas excéder le triple de celle de leur reproduction définitive (justification de la revue: 11,5 x 17,5cm) et les

auteurs choisiront l'épaisseur des traits et la taille des caractères en fonction de la réduction éventuelle.

CRYPTOGAMIE, Mycologie, accepte les textes en mode ASCII sur disquettes 3"1/2 ou 5" 1/4 de micro-ordinateur (IBM, IBM compatible et MacIntosh). Ils doivent être **impérativement** conformes aux instructions suivantes:
- ne pas utiliser de codes spéciaux de mise en page ou de format (gras, italiques, centrage, etc.);
- ne pas couper les mots;
- ne pas justifier à droite;
- les mots (ou les groupes de mots) qui doivent apparaître en italiques lors de l'impression devront être encadrés par un des caractères suivants: #, £, S.
- ne pas insérer de code de fin de page;

Les disquettes, accompagnées d'une copie sur papier comportant le texte final corrigé selon les avis du Comité de Lecture, seront adressées à la Rédaction.

Les tirages à part sont à la charge des auteurs.

Conformément à la règle, les auteurs décrivant une espèce nouvelle doivent déposer le matériel type (échantillon sec ou culture) dans un herbier officiel: P.C. (Paris, Cryptogamie), CAB-IMI (Kew, Surrey) ou une collection de souches: L.C.P. (Lab. Cryptogamie, Paris), CAB-IMI, C.B.S. (Baarn, Hollande), etc.

Commission paritaire n° 58611
Dépôt légal n° 14986 - Imprimerie de Montligeon
Sortie des presses le 20 mars 1990
Imprimé en France
Éditeur : A.D.A.C. (Association des Amis des Cryptogames)
Président : A. Couté; Secrétaire : D. Lamy
Trésorier : R. Baudoin; Directeur de la publication : H. Causse

CRYPTOGAMIE – MYCOLOGIE

Les manuscrits doivent être adressés (en 2 exemplaires) directement à un membre du Bureau de Rédaction, choisi pour sa spécialité. Le Bureau peut demander l'avis d'un lecteur choisi pour sa spécialité, même s'il n'appartient pas au Comité de lecture.

Bien qu'étant avant tout une revue de langue française, les articles rédigés en Anglais, Allemand et Espagnol sont acceptés.

Les recommandations aux auteurs sont publiées dans le 1er fascicule de chaque tome.

ABONNEMENTS A CRYPTOGAMIE
Tome 11, 1990

CRYPTOGAMIE comprend trois Sections:
Algologie - Bryologie Lichénologie - Mycologie

Abonnement à l'une ou l'autre Section pour 1990:
France .... ([illegible] F HT) [illegible] F TTC
Etranger .... [illegible] F

Abonnement aux 3 Sections pour 1990:
France .... (918 F HT) [illegible] F TTC
Etranger .... 1000,00 F

Les anciens tomes et fascicules séparés de la REVUE DE MYCOLOGIE et de CRYPTOGAMIE-MYCOLOGIE sont toujours disponibles.

MÉMOIRES HORS SÉRIE

Nº 2 (1942). **Les matières colorantes des champignons**, par I. Pastac. 88 pages : 15 F.

Nº 3 (1943). **Les constituants de la membrane chez les champignons**, par R. Ulrich. 44 pages : 15 F.

Nº 6 (1958). **Essai biotaxonomique sur les Hydnes résupinés et les Corticiés**, par J. Boidin. 390 pages, pl. et fig. : 120 F.

Nº 7 (1959). **Les champignons et nous** (Chroniques) (II), par G. Becker. 94 pages : 25 F.

Nº 8 (1966). **Catalogue de la Mycothèque** de la Chaire de Cryptogamie du Muséum National d'Histoire Naturelle. (I) Micromycètes. Macromycètes (première partie). 68 pages : 25 F.

Nº 9 (1967). **Table des Matières** (1936-1965). 85 pages : 30 F. - (1966-1975). 30 pages : 10 F.

FLORE MYCOLOGIQUE DE MADAGASCAR ET DÉPENDANCES
publiée sous la direction de M. Roger HEIM

Tome I. Les Lactario-Russulés, par Roger Heim (1938) *(épuisé)*.

Tome II. Les Rhodophylles, par Henri Romagnesi (1941). 164 pages, 46 fig. : 90 F.

Tome III. Les Mycènes, par Georges Métrod (1949). 144 pages, 88 fig. : 90 F.

Tome IV. Les Discomycètes de Madagascar, par Marcelle Le Gal (1953). 465 pages, 172 fig. : 150 F.

Tome V. Les Urédinées, par Gilbert Bouriquet et J.P. Bassino (1965). 180 pages, 97 fig., 4 pl. hors-texte : 90 F.

Règlements

- *par virement postal au nom de A.D.A.C. - CRYPTOGAMIE 12, rue Buffon, 75005 Paris. C.C.P. SCE 34 764 05S*
- *par chèque bancaire établi au même ordre.*